

MYRIAM EMIKO TAKAHASHI

**Análise das atividades anti-inflamatória e toxicológica do extrato
alcoólico da *Agave sisalana*: um estudo *in vitro***

**ASSIS
2020**

MYRIAM EMIKO TAKAHASHI

**Análise das atividades anti-inflamatória e toxicológica do extrato
alcoólico da *Agave sisalana*: um estudo *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Prof. Dr. Dario Abel Palmieri

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lucinéia dos Santos

ASSIS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Laura Akie Saito Inafuko - CRB 8/9116

T136a Takahashi, Myriam Emiko
Análise das atividades anti-inflamatória e toxicológica do extrato alcoólico da Agave sisalana: um estudo in vitro / Myriam Emiko Takahashi. Assis, 2020.
75 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. Darío Abel Palmieri
Coorientador: Dra. Lucinéia dos Santos

1. Tecnologia farmacêutica. 2. Matéria médica vegetal.
3. Inflamação. 4. Macrófagos. 5. Testes de toxicidade. I.
Título.

CDD 615.321



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Assis



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Análise das atividades anti-inflamatória e toxicológica do extrato alcoólico da **Agave sisalana**: um estudo *in vitro**

AUTORA: MYRIAM EMIKO TAKAHASHI

ORIENTADOR: DARÍO ABEL PALMIERI

COORIENTADORA: LUCINÉIA DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS, área: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCINÉIA DOS SANTOS
Departamento de Biotecnologia / UNESP/Assis

Prof. Dr. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES
Departamento de Biotecnologia / UNESP/Assis

Profa. Dra. DEBORA DE BARROS BARBOSA
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / UNESP/Araçatuba

Assis, 05 de junho de 2020

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Katie Suda Takahashi e Yutaka Takahashi, meus primeiros mestres, responsáveis pela minha formação pessoal.

Ao meu namorado, Helio Mise, por estar do meu lado.

À minha coorientadora Profa. Dra. Lucinéia dos Santos, pela parceria e pelos valiosos ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dario Abel Palmieri, pelo grande apoio e pela oportunidade da orientação.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, pelas valiosas contribuições, por ceder o espaço físico do Laboratório GenteCel e aceitar ser membro da Banca de Qualificação e de Defesa.

À Profa. Dra. Edislane Barreiros de Souza, por aceitar ser membro da Banca de Qualificação e pelas valorosas contribuições.

Ao Prof. Dra. Débora Barros Barbosa, que gentilmente aceitou ser membro da Banca de Defesa.

A toda a equipe do Laboratório Fitotec da FCL/Unesp-Assis, em especial à Júlia Fracasso e Mariana Parron, que me ajudaram no fim do projeto com a parte experimental.

Aos funcionários da FCL/Unesp-Assis e outros que não foram mencionados, que contribuíram de forma significativa para o andamento deste trabalho.

TAKAHASHI, Myriam Emiko. **Análise das atividades anti-inflamatória e toxicológica do extrato alcoólico da *Agave sisalana*: um estudo *in vitro***. 2020. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2020.

RESUMO

A família Agaveaceae possui 136 espécies cultivadas na maior parte do mundo e o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de *Agave sisalana* – o sisal –, cujo estado com maior produção de sisal é a Bahia, com 95,2% da produção nacional. O material residual do processo de desfibramento das folhas compõe 95-97% do peso das folhas, sendo designado por mucilagem, que geralmente é descartado no solo. A preocupação mundial com a sustentabilidade está levando à busca de estratégias inovadoras para o reaproveitamento de resíduos agrícolas. Assim, ao agregar valor ao resíduo do sisal, além de se promover a redução de um expressivo impacto ambiental, haverá, com certeza, um incremento social e econômico, visto que a região sisaleira é uma das mais pobres do Brasil. Como ainda é muito pouco relatado o uso do resíduo do sisal no desenvolvimento de medicamentos, o presente trabalho, por meio da realização de testes *in vitro*, visou complementar estudos farmacológicos e toxicológicos *in vivo*, realizados anteriormente no laboratório Fitotec da FCL/Unesp, campus de Assis. Desta forma, foi avaliada pela primeira vez *in vitro* as atividades anti-inflamatória e toxicológica de um extrato obtido do suco do sisal (FAEHA). Em complemento, a fim de estabelecer uma relação entre a composição química e a atividade farmacológica do extrato, foi determinada a concentração das saponinas no extrato, bem como, identificada a presença de sapogeninas. Para isso, inicialmente, o extrato foi preparado com o resíduo do sisal, e diluído em três concentrações: 2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os testes toxicológicos foram avaliados mediante cultura de células mononucleares do sangue humano, em triplicata. Os testes anti-inflamatórios foram realizados com macrófagos extraídos de lavado peritoneal, em triplicata, obtidos de camundongos *Swiss* identificados morfologicamente com base na coloração de Wright. A concentração de saponinas foi determinada por espectrofotometria UV-Vis e a presença de sapogeninas por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Os resultados demonstraram que nos testes de citotoxicidade realizados (Teste do MTT, teste de exclusão do azul de Trypan e ensaio de incorporação do vermelho neutro) as concentrações não se mostraram citotóxicas. Os testes antiinflamatórios *in vitro* (fagocitose, retenção de lisossomos e espraiamento de macrófagos) comprovaram que o extrato, em todas as concentrações testadas, apresentou expressiva atividade anti-inflamatória *in vitro*. A análise fitoquímica realizada com o FAEHA sugere que a atividade anti-inflamatória *in vitro* pode ser atribuída à presença de saponinas e das sapogeninas hecogenina e tigogenina. Portanto, a confirmação *in vitro* da baixa toxicidade do FAEHA e de sua alta atividade anti-inflamatória, anteriormente observadas *in vivo*, coloca esse extrato como potencial candidato ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. O reaproveitamento de suco de sisal pode, assim, configurar-se como uma estratégia inovadora e de fundamental importância para diminuir o impacto ambiental e agregar valor econômico e social a este resíduo agrícola.

Palavras-chave: Tecnologia Farmacêutica. Medicamentos Fitoterápicos. Inflamação. Macrófagos. Testes de toxicidade. Mucilagem vegetal.

TAKAHASHI, Myriam Emiko. **Analysis of the anti-inflammatory and toxicological activities of the alcoholic extract of *Agave sisalana*: an *in vitro* study**. 2020. 75 p. Dissertation (Masters in Bioscience) – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2020.

ABSTRACT

The Agaveaceae family has 136 species grown in most parts of the world and Brazil is the world's largest producer and exporter of *Agave sisalana*, - the sisal -, the state with the highest sisal production is Bahia, with 95.2% of the national production. The residual material from the leaf defibration process makes up 95-97% of the leaf weight, being called mucilage, which is usually discarded in the soil. The global concern with sustainability is leading to the search for innovative strategies for the reuse of agricultural waste. Thus, when adding value to the sisal residue, in addition to reducing a significant environmental impact there will certainly be a social and economic increase, since the sisal region is one of the poorest in Brazil. As the use of sisal residue in the development of medicines is still very little reported, the present work, through *in vitro* tests, aimed at complementing pharmacological and toxicological studies *in vivo*, previously carried out at the Fitotec laboratory of FCL / Unesp, campus of Assis. Thus, the anti-inflammatory and toxicological activities of an extract obtained from sisal juice (FAEHA) were evaluated for the first time *in vitro*. In addition, in order to establish a relationship between the chemical composition and the pharmacological activity of the extract, the concentration of saponins in the extract was determined, as well as, the presence of sapogenins was identified. To this end, initially, the extract was prepared with the sisal residue, and diluted in three concentrations: 2.0 mg / mL, 1.0 mg / mL and 0.5 mg / mL. Toxicological tests were evaluated by Peripheral Blood Mononuclear Cells, in triplicate. The anti-inflammatory tests were performed with macrophages extracted from peritoneal lavage, in triplicate, obtained from Swiss mice identified morphologically based on Wright's stain. The concentration of saponins was determined by UV-Vis spectrophotometry and the presence of sapogenins by high resolution mass spectrometry (HRESI-MS). The results demonstrated that in the cytotoxicity tests performed (MTT test, Trypan blue exclusion test and neutral red incorporation test) the concentrations were not shown to be cytotoxic. The anti-inflammatory tests *in vitro* (phagocytosis, lysosome retention and spreading of macrophages) proved that the extract, in all tested concentrations, showed significant anti-inflammatory activity *in vitro*. Phytochemical analysis performed with FAEHA suggests that the anti-inflammatory activity *in vitro* can be attributed to the presence of saponins and sapogenins hecogenin and tigogenin. Therefore, the *in vitro* confirmation of the low toxicity of FAEHA and its high anti-inflammatory activity, previously observed *in vivo*, put this extract as a potential candidate for the development of a herbal medicine. The reuse of sisal juice can thus be configured as an innovative strategy and of fundamental importance to reduce the environmental impact and add economic and social value to this agricultural waste.

Keywords: Technology, Pharmaceutical. Phytotherapeutic Drugs. Inflammation. Macrophages. Toxicity Tests. Plant Mucilage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção do lavado do líquido peritoneal de camundongos em alguns momentos: (A) extração do lavado do líquido peritoneal com pipeta Pasteur, (B) centrifugação do lavado do líquido peritoneal, (C) lavado do líquido peritoneal após a centrifugação.....	28
Figura 2 - Células PBMC obtidas do sangue humano – em lâmina - coloração de Wright – aumento de 100 x.....	34
Figura 3 - Média \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste do MTT para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA <i>two-way</i> seguida do teste <i>post-hoc</i> de Tukey.....	37
Figura 4 - Células viáveis que não foram coradas com azul de Trypan (A) e células não viáveis que se coraram com azul de Trypan (B). A visualização dessas células se deu em microscópio óptico binocular, a contagem foi realizada na câmara de Neubauer – aumento 400x.....	38
Figura 5 - Média \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste de exclusão do Azul de Trypan, para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. Teste de Kruskal-Wallis, seguida do teste <i>post-hoc</i> de Student-Newman-Keuls, comparado ao CN solução fisiológica.....	39
Figura 6 - Média \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no ensaio de incorporação do vermelho neutro para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste <i>post-hoc</i> de Tukey.....	40
Figura 7 - Viabilidade celular em população de PBMC após 24 horas de incubação com o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL determinado por teste de MTT (A), teste de exclusão do Trypan (B), ensaio de incorporação de vermelho neutro (C).....	41
Figura 8 - Fotomicrografias do lavado peritoneal (em lâmina) expostos pela coloração de Wright, evidenciando a população de células e a presença de macrófagos (seta em preto) – aumento 100x.....	45

Figura 9 - Contagem diferencial das células encontradas no lavado do líquido peritoneal.....	45
Figura 10 - Média \pm EPM dos valores das absorvâncias de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e a FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste <i>post-hoc</i> de Tukey.....	46
Figura 11- Média \pm EPM dos valores das absorvâncias de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste <i>post-hoc</i> de Tukey.....	48
Figura 12-Média \pm EPM dos valores de inibição de espraiamento de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste <i>post-hoc</i> de Tukey.....	50
Figura 13-Fotos obtidas de macrófagos não-espraiados do grupo CP (A), de macrófagos espraiados e não-espraiados com o tratamento do FAEHA 2,0 mg/mL (B) e de macrófagos espraiados com o tratamento do FAEHA 0,5 mg/mL (C) – aumento 100 x.....	51
Figura 14-Curva de regressão linear com a saponina Merck nas concentrações de 0,08 a 0,28 mg/mL.....	55
Figura 15-Espectros obtidos na análise da FAEHA por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Picos identificados de hecogenina e tigogenina.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos para os testes toxicológicos de Teste do MTT (tempo 24, 48 e 72 horas), Teste de exclusão do azul de Trypan (24 horas) e Ensaio de incorporação do vermelho neutro (24 horas).....	24
Tabela 2 - Descrição dos grupos para os testes anti-inflamatórios Teste da fagocitose, Retenção de lisossomos e Espreadimento de macrófagos.....	27
Tabela 3 - Média (%) \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste do MTT para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN - Controle Negativo – solução fisiológica, CP - Controle Positivo - Tween 80 0,01% diluído em solução fisiológica e FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL.....	35
Tabela 4 - Média e EPM dos valores de inibição de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste da fagocitose. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL	47
Tabela 5 - Média e EPM dos valores de inibição de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste de retenção de lisossomos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e extrato nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL.....	49
Tabela 6 - Média e EPM dos valores da % de inibição do espreadimento para cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste <i>post-hoc</i> de Tukey.....	51
Tabela 7 - Massa das moléculas de hecogenina e tigogenina presentes na FAEHA e obtidas por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	- Controle Negativo
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	- Controle Positivo
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DL 50	- Dose Letal mediana
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EDTA	- Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPC	- Edema de Pata por Carragenina
EPM	- Erro Padrão Médio
FAEHA	- Fração Alcoólica do Extrato de sisal por Hidrólise Ácida
IC 50	- Concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas
ISO	- Organização Internacional de Padronização (<i>International Organization for Standardization – ISO</i>)
PBMC	- <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PNCQ	- Programa Nacional de Controle de Qualidade
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBAC	- Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
SBCAL	- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Unicamp	- Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	<i>Agave sisalana</i>	12
1.2	Composição química da <i>Agave sisalana</i>	13
1.3	O processo inflamatório	14
1.4	O uso de métodos <i>in vitro</i> para avaliação da atividade anti-inflamatória no desenvolvimento de novos medicamentos	16
1.5	Toxicidade de extratos vegetais e métodos toxicológicos <i>in vitro</i>	18
1.6	Objetivos	21
2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1	Animais	22
2.2	Material de origem vegetal	22
2.3	Preparação do extrato do sisal (FAEHA)	22
2.4	Obtenção de células mononucleares do sangue total humano (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC</i>)	23
2.5	Testes de toxicidade <i>in vitro</i>	24
2.5.1	Teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]	24
2.5.2	Teste de exclusão do azul de Trypan	25
2.5.3	Ensaio de incorporação do vermelho neutro	26
2.6	Ensaio da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	26
2.6.1	Obtenção de macrófagos de camundongos	27
2.6.2	Seleção dos macrófagos	28
2.6.3	Teste da fagocitose em cultura de macrófagos	29
2.6.4	Retenção de lisossomos	29
2.6.5	Espraiamento de macrófagos	30
2.7	Determinação das concentrações de saponinas e sapogeninas	31
2.8	Análise estatística	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	Obtenção de células mononucleares do sangue total humano (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC</i>)	33

3.2	Determinação de toxicidade <i>in vitro</i>	34
3.2.1	Resultados obtidos no teste de citotoxicidade MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]	35
3.2.2	Resultados obtidos no teste de exclusão do azul de Trypan	37
3.2.3	Resultados obtidos no ensaio de incorporação do vermelho neutro	39
3.2.4	Discussão dos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade	41
3.3	Ensaio da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	44
3.3.1	Contagem diferencial de leucócitos do lavado peritoneal	44
3.3.2	Resultados obtidos no teste da fagocitose	45
3.3.3	Resultados obtidos no teste de retenção de lisossomos	47
3.3.4	Resultados obtidos no teste de espriamento de macrófagos	49
3.3.5	Discussão dos resultados obtidos nos testes anti-inflamatórios <i>in vitro</i>	52
3.4	Ensaio para a determinação da concentração de saponinas e detecção de sapogeninas	54
3.4.1	Resultado obtido no método de determinação da concentração de saponinas	54
3.4.2	Resultado obtido no método de detecção das sapogeninas	55
3.4.3	Discussão dos resultados obtidos nos ensaios para a determinação da concentração de saponinas e detecção de sapogeninas	57
4	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES <i>IN VITRO</i>	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Agave sisalana*

A família Agaveaceae possui 136 espécies cultivadas na maior parte do mundo e se concentra em regiões tropicais e áridas (NOBEL; MCDANIEL, 1988). O gênero *Agave* compreende cerca de 211 espécies (MONJA-MIO *et al.*, 2019). A *Agave sisalana*, popularmente conhecida como sisal, se originou nas florestas tropicais da América do Norte, sobretudo do México. Em virtude das alterações morfológicas e fisiológicas da planta, como presença de sistema radicular estendido – cutículas espessas e ceras epicuticulares –, que confere resistência a patógenos, radiação solar, seca e frio (MONJA-MIO *et al.*, 2019), a *Agave sisalana* se adaptou bem em regiões secas do Nordeste brasileiro (QUEIROZ *et al.*, 2012). Desta forma, representa uma das poucas espécies agrícolas resistentes e viáveis ao clima semiárido (CARDOSO, 2019).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial do sisal (BOTURA *et al.*, 2013), cujo estado com maior produção de sisal é a Bahia, que concentra 95,2% da produção nacional (BRASIL, 2017).

As espécies do gênero *Agave* possuem grande importância econômica mundial por constituírem-se fonte de fibras naturais para a confecção de diferentes produtos industriais, tais como suplementos alimentares e bebidas alcoólicas (MONJA-MIO *et al.*, 2019). Entretanto, nas regiões semiáridas do Nordeste brasileiro das folhas do sisal são extraídas e aproveitadas somente suas fibras duras (BOTURA *et al.*, 2013). Essas fibras correspondem a 3-5% do peso da folha do sisal e tem importância comercial para a fabricação de polímeros que originarão componentes plásticos na indústria automobilística, na fabricação de pasta celulósica, que dará origem ao papel Kraft, de alta resistência, na produção de cordas, vassouras, artesanato, entre outros produtos (SILVA *et al.*, 2008). O material resultante do processo de desfibramento das folhas compõe 95-97% do peso das folhas, sendo designado de mucilagem, composto por resíduos sólidos e líquidos, que geralmente são descartados no solo (YISHUO *et al.*, 2018; ARALDI *et al.*, 2018).

A questão da sustentabilidade representa, atualmente, uma preocupação de âmbito global e com a necessidade de promover o incremento social e econômico de famílias de baixa renda está levando à busca de estratégias inovadoras para o

reaproveitamento de grande perda de resíduos agrícolas. Assim, ao agregar valor ao resíduo do sisal, por meio do comércio de produtos desenvolvidos com este material, provavelmente promoverá uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil, uma das mais pobres do país, onde os pequenos produtores rurais dificilmente alcançam uma renda mensal de um salário mínimo (CARDOSO, 2019).

Há relatos, na literatura, sobre a possibilidade de uso dos resíduos de *Agave sisalana* como fertilizantes orgânicos e suplemento alimentar de ruminantes (BOTURA *et al.*, 2011). Também, está em fase de pesquisa a produção de biogás para geração de energia (TERRAPON-PFAFF; FISCHEDICK; MONHEIM, 2012). Entretanto, ainda é muito pouco explorado o uso do resíduo do sisal na produção de medicamentos (BOTURA *et al.*, 2011). Existem relatos sobre as atividades anti-helmínticas *in vitro* e *in vivo* (ZAJÍCKOVÁ *et al.*, 2020; BOTURA *et al.*, 2013) e citotóxica contra hemócitos de *Aedes aegypti* (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

1.2 Composição química da *Agave sisalana*

Os poucos estudos fitoquímicos realizados até o momento com o resíduo do sisal evidenciam a possibilidade de seu uso no desenvolvimento de novos medicamentos. Nesta direção, na mucilagem de *Agave sisalana* foram encontrados flavonoides com alta atividade terapêutica como quercetina e kaempferol (PUENTE-GARZA *et al.*, 2017) e um alto teor de saponinas esteroidais (ARALDI *et al.*, 2018; ALCAZAR *et al.*, 2017; SIDANA; SINGH; SHARMA, 2016; CERQUEIRA *et al.*, 2012; DUNDER *et al.*, 2013; DUNDER *et al.*, 2010).

Saponinas esteroidais representam uma classe de metabólitos secundários que possui em sua estrutura uma parte lipofílica (aglicona ou sapogenina) e outra hidrofílica (açúcares) (DONG *et al.*, 2019; SIMÕES *et al.*, 2010). As saponinas podem ser classificadas de acordo com a aglicona, podendo ser esteroidais ou triterpênicas. Também podem ser classificadas pelo seu caráter ácido, básico ou neutro (DONG *et al.*, 2019; SIMÕES *et al.*, 2010).

As saponinas esteroidais presentes na mucilagem do sisal despertam grande interesse. Isso porque, na indústria farmacêutica se apresentam como uma das principais fontes na síntese química de importantes medicamentos (ARALDI *et al.*, 2018), tais como: os hormônios sexuais, os diuréticos esteroidais, os

hipocolesteromiantes, os anti-inflamatórios glicocorticoides e antivirais (RAFIŃSKA *et al.*, 2017; SIMÕES *et al.*, 2010). Dessa forma, na literatura, há relatos de que as saponinas esteroidais possuem inúmeras atividades terapêuticas (DONG *et al.*, 2019; PUENTE-GARZA *et al.*, 2017).

Ding *et al.* (1989) relataram que por meio da hidrólise ácida da mucilagem da *Agave sisalana* é possível extrair as cadeias de açúcar das moléculas de saponinas e obter principalmente duas sapogeninas – hecogenina e tiogenina. Em complemento, na composição da mucilagem da *Agave spp.* foram encontrados heteropolissacarídeos como a pectina, utilizada na indústria de medicamentos para diminuir o colesterol total, diminuir a absorção de glicose e evitar a absorção de toxinas produzidas no cólon, reduzindo a incidência de câncer (MARAN; PRIYA, 2015; SANTOS *et al.*, 2013).

1.3 O processo inflamatório

A inflamação é uma resposta à infecção ou lesão tecidual que ocorre para erradicar microrganismos, células danificadas ou agentes irritantes e para potencializar a reparação tecidual (KHAN *et al.*, 2020). Assim, as reações inflamatórias têm papel importante na proteção do organismo (KOMAKECH *et al.*, 2019). Porém, quando ativada de forma excessiva ou crônica, a inflamação pode causar o comprometimento de órgãos e sistemas, levando a descompensação, disfunção orgânica e morte. Atualmente, é reconhecido que a inflamação está implicada em diversas doenças, infecciosas e não-infecciosas, destacando doenças causadas por protozoários e bactérias, doenças do sistema cardiovascular, neuropatias, doenças pulmonares, esclerose múltipla, doenças autoimunes e câncer (ARYAEIAN *et al.*, 2019; MAYASSI *et al.*, 2019; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; WEINTRAUB, 2012; DUNDER *et al.* 2010). Apesar deste conhecimento, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas doenças de natureza inflamatória ainda não estão totalmente elucidados, o que acarreta a aplicação de terapias mais efetivas. Assim, o contínuo investimento em pesquisas é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

O entendimento sobre a participação das células no processo inflamatório, de acordo com Viehmann *et al.* (2018), se deu por meio da realização de inúmeras pesquisas, em diferentes momentos. Mais propriamente, esta participação começa a

ser entendida a partir da segunda metade do século XIX, quando Virchow, Arnold e Metchnikoff descreveram o papel das células próprias dos tecidos lesados e das células migratórias, bem como o fenômeno da fagocitose. No século XX, foi descrito o envolvimento dos mastócitos na reação tríplice cutânea, dos macrófagos na constituição de granulomas e dos linfócitos como célula imunocompetente.

Atualmente, está bem estabelecido que os monócitos dão origem às células dendríticas e macrófagos, e contribuem para a inflamação local e sistêmica. Para isso, os monócitos inflamatórios clássicos contêm receptores ligados à superfície (*Tool-like*) e reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos. Trafegam seletivamente para os locais de inflamação, produzem citocinas inflamatórias e podem ser diferenciados em macrófagos inflamatórios e células dendríticas (FENG *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2014). Desta forma, no estado estacionário, os monócitos anti-inflamatórios controlam o sistema vascular para monitorar os padrões moleculares associados a patógenos. Durante a inflamação, por mecanismos complexos, os monócitos são estimulados a migrar do sangue para as áreas inflamadas e se transformam em macrófagos fixos ao penetrarem os tecidos periféricos (YONG *et al.*, 2017; HANIFFA; BIGLEY; COLLIN, 2015). Citam-se como macrófagos fixos ou residentes: células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares nos pulmões, células da microglia no tecido nervoso, siderócitos em órgãos linfoides, macrófagos de cavidades serosas (peritoneais e pleurais) e histiócitos do tecido conjuntivo (SAMPAIO *et al.*, 2001).

Os macrófagos merecem destaque no processo inflamatório por desempenharem importantes funções: 1) reconhecimento, internalização e remoção de patógenos; 2) ativação da imunidade adaptativa das células T; 3) liberação de agentes microbicidas como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio por meio do processamento e apresentação de antígenos; 4) secreção de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas; e 5) reparo tecidual (YONG *et al.*, 2017; SAMPAIO *et al.*, 2001).

De modo geral, a resposta inflamatória mostra-se própria, no sentido de promover a recuperação tecidual de forma rápida e efetiva. Entretanto, esta pode se tornar imprópria e crônica, levando à ocorrência de lesões teciduais persistentes e das doenças sistêmicas (FENG *et al.*, 2019). Nesta situação, faz-se necessário o uso de medicamentos anti-inflamatórios. Porém, esses medicamentos promovem inúmeros efeitos colaterais. Os anti-inflamatórios não-esteroidais podem gerar complicações na

função gastrointestinal, renal e cardiovascular. Os anti-inflamatórios esteroidais, além desses efeitos colaterais, promovem alterações no nível de glicose no sangue, na densidade óssea e na taxa sanguínea de alguns hormônios. E ainda tem efeito imunossupressor, ao bloquear enzimas quinases, úteis na manutenção da imunidade do hospedeiro tornando os indivíduos predispostos às infecções, (RANG *et al.*, 2011).

1.4 O uso de métodos *in vitro* para avaliação da atividade anti-inflamatória no desenvolvimento de novos medicamentos

Diante dos inúmeros efeitos provocados pelos anti-inflamatórios, no desenvolvimento de novos medicamentos, que visem tratar as doenças inflamatórias crônicas e severas, o uso de plantas medicinais mostra-se promissor (FENG *et al.*, 2019).

Nesta direção, o emprego de plantas medicinais, ricas em compostos bioativos, mostra-se como uma importante ferramenta (KOMAKECH *et al.*, 2019). Para isso, a fim de que uma planta medicinal se torne matéria-prima para o desenvolvimento de um fitoterápico com propriedade anti-inflamatória, é preciso que seja assegurada na formulação a integridade química e farmacológica do vegetal, bem como baixa ou nenhuma toxicidade e de instabilidade genômica. Com esse propósito, uma série de estudos *in vivo* é empregada a fim de se avaliar as atividades farmacológicas e toxicológicas do extrato vegetal da planta, das frações do extrato, ou mesmo das substâncias isoladas deste elemento (SIMÕES *et al.*, 2010). Para o estudo da eficácia e segurança do fitoterápico desenvolvido será necessária a realização de estudos farmacológicos e toxicológicos *in vivo* – agudo e crônico –, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (BRASIL, 2014a).

Entretanto, seguindo uma tendência mundial de reduzir o número de animais nas avaliações farmacológicas, alguns testes *in vitro*, de caráter preditivo, têm sido introduzidos às pesquisas com plantas medicinais. Um exemplo é o teste de fagocitose com zimosan ligado ao corante vermelho neutro, que tem sido utilizado na avaliação da atividade anti-inflamatória (OTA *et al.*, 2010). O zimosan é uma partícula derivada da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, rica em betaglucanos e mananos (SIGOLA *et al.*, 2016; FUENTES; MILLIS; SIGOLA, 2011). O zimosan tem a capacidade de induzir a inflamação, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas, e o mecanismo de fagocitose. A fagocitose do zimosan está

acompanhada pelo recrutamento dos receptores de membrana dos macrófagos: *Toll-like* TLR2 e TLR6. Esses receptores reconhecem as betaglucanas do zimosan e estimulam a fagocitose dessas partículas ligadas ao corante vermelho neutro, formando o fagossomo (UNDERHILL, 2003).

Outro teste usado na avaliação da atividade anti-inflamatória é o de retenção de lisossomos. Para a compreensão do embasamento metodológico deste teste, é importante considerar que o fagossomo, no interior do macrófago, ao se fundir com o lisossomo recebe todo o seu conteúdo enzimático e uma grande quantidade de íons H⁺. Assim, o fagolisossomo – compartimento resultante da fusão do fagossomo com os lisossomos – apesar de sua morfologia simples, do ponto de vista de organização molecular é muito complexo. Apresenta em seu lúmen proteínas estruturais, transportadores de membrana e dezenas de tipos diferentes de enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases, glicosidases, nucleases e fosfatases. Desta forma, o fagossomo necessita das enzimas lisossomais para digerir os compostos orgânicos que foram fagocitados. Em complemento, a alta concentração de íons H⁺ fornecida pelos lisossomos permite que os fagossomos consigam eliminar os restos fagocitados. Assim, nos processos inflamatórios, durante o processo de fagocitose, o pH dos lisossomos diminui ainda mais (SOUZA *et al.*, 2011).

O corante vermelho neutro é uma substância lipofílica, catiônica que transita entre as membranas celulares, por meio da difusão passiva. O fluxo do corante a favor do gradiente ocorre do citoplasma do macrófago para o interior do lisossomo. No interior dessa organela, o vermelho neutro recebe um próton, em virtude do baixo pH, e fica retido (SOUZA *et al.*, 2011). Quanto maior a resposta inflamatória maior será a acidez no interior dos lisossomos e maior o acúmulo do vermelho neutro (RINGROSE; PARR; MCLAREN, 1975).

Outro teste anti-inflamatório *in vitro* é o do espriamento de macrófagos. O espriamento é definido, em geral, como uma tentativa frustrada de fagocitose, entretanto, como não há uma substância ou microrganismo para ser fagocitado, tem-se que o espriamento se trata apenas da ação de uma célula responsiva com capacidade de se aderir à lâmina e emitir microvilos (DELLA LIBERA *et al.*, 2006; RABINOVITCH *et al.*, 1977). Na presença de compostos anti-inflamatórios, espera-se que o espriamento seja inibido (SARTIM, MENALDO, SAMPAIO, 2018; SAMPAIO *et al.*, 2001). Para avaliar essa ação, as células espriadas e não-espriadas são

quantificadas para calcular a porcentagem de inibição de espraiamento (PERES; CURI, 2005).

1.5 Toxicidade de extratos vegetais e métodos toxicológicos *in vitro*

Os testes toxicológicos desenvolvidos a partir de modelos experimentais com animais, que avaliam os níveis de segurança da exposição aos produtos químicos para a saúde humana e ao meio ambiente, são de extrema importância. Assim, no desenvolvimento de um medicamento com extratos vegetais faz-se necessária a realização de uma série de estudos *in vivo*, a fim de avaliar e comprovar a ausência de toxicidade (SIMÕES *et al.*, 2010). No Brasil, os estudos toxicológicos *in vivo* são estabelecidos pela Anvisa e são realizados após tratamento agudo e crônico (BRASIL, 2014a).

Porém, como já citado, nos estudos toxicológicos também há uma grande pressão dos órgãos reguladores para que os testes sejam realizados *in vitro*, utilizando um número cada vez menor de animais (NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS, 2005). Até mesmo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) instituiu a Resolução Normativa 18/2014, que reconhece os métodos alternativos em substituição ao uso de animais. Sendo esses métodos posteriormente reconhecidos pela Anvisa (RDC 35/2015). Por meio dessas legislações foram reconhecidos 17 métodos alternativos – entre eles o de toxicidade aguda – que deverão substituir os métodos originais (BRASIL, 2014b; BRASIL, 2015). Também, em 2016, o CONCEA reconheceu mais sete métodos alternativos ao uso de animais (BRASIL, 2016).

Nesta direção, estão sendo estabelecidos vários testes que determinam a citotoxicidade dos produtos *in vitro*, utilizando cultura de células. De acordo com a Organização Internacional de Padronização (*International Organization for Standardization* - ISO), por meio destes testes é possível observar efeitos dos produtos sobre o crescimento, a reprodução e a morfologia das células que estão sendo avaliadas (SRIVASTAVA *et al.*, 2018; LI; ZHOU; XU, 2015). Sendo os efeitos toxicológicos observados pela manifestação de pequenas alterações celulares ou grandes alterações que podem promover a morte celular.

Os testes de citotoxicidade possibilitam a análise de importantes parâmetros. Um desses parâmetros é o da viabilidade celular, que se caracteriza por porcentagem

de células vivas do material testado em relação à porcentagem de células do controle (ROGERO *et al.*, 2003). Segundo a ISO 10993, um produto testado é considerado citotóxico quando a viabilidade da cultura de células diminui para <70% em comparação ao grupo que foi estabelecido como 100% de viabilidade (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Outro possível parâmetro de ser analisado é o da IC50, que corresponde à concentração inibitória para 50% das células testadas. A partir do valor da IC50 é possível estimar a dose inicial a ser empregada em testes de toxicidade oral aguda realizados em animais de laboratórios. A realização desse teste também permite determinar a LD50, que corresponde à dose oral que provoca a morte de 50% dos animais testados (VALADARES, 2006).

Nos estudos que avaliam a citotoxicidade, os testes de exclusão de azul de Trypan, do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) e do corante vermelho neutro são largamente empregados (BADERNA; CALONI; BENFENATI, 2019). O teste de exclusão do azul de Trypan é um teste cujas células são avaliadas por microscopia que avalia o efeito das substâncias sobre a integridade da membrana celular. As células que sofreram lise celular se tornam permeáveis ao corante e são contadas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico. Assim, as células coradas em azul são consideradas inviáveis e as células não permeáveis ao corante são consideradas como viáveis (MARCISSIO *et al.*, 2012).

O teste do MTT baseia-se na redução do sal de tetrazólio [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (coloração amarela) a cristais de formazan (coloração roxa) pela ação de enzimas mitocondriais. Assim, esta reação é possível apenas em células vivas e que estejam com atividade mitocondrial ativa. Este é um teste colorimétrico rápido, muito utilizado em laboratórios de pesquisa, versátil e pode ser realizado em vários tipos de células de mamíferos (MOSMANN, 1983).

A incorporação do corante vermelho neutro (hidroclorato de 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-fenazina) aos lisossomos também é usada para avaliar a citotoxicidade celular. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco que atravessa as membranas celulares e se acumula dentro dos lisossomos por intermédio de ligações eletrostáticas com componentes aniônicos. Esta reação ocorre somente em células vivas onde o pH dos lisossomos é menor que o do citoplasmático. Em células mortas

o corante não consegue entrar (BORENFREUND; PUERNER, 1985; CUDAZZO *et al.*, 2019).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivos gerais

Este trabalho realizou estudos farmacológicos e toxicológicos *in vitro* de um extrato obtido do suco da *Agave sisalana* – sisal - que já foi anteriormente avaliado *in vivo*, a fim de complementar os resultados já obtidos. Em uma segunda etapa, com o intuito de estabelecer uma relação entre a composição química e a atividade farmacológica do extrato, foi determinada a concentração das saponinas no extrato, bem como identificada a presença de sapogeninas.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Preparo de um extrato vegetal obtido a partir do resíduo da *Agave sisalana* (FAEHA);
2. Cultivo celular de macrófagos e PBMC;
3. Avaliação do perfil toxicológico do (FAEHA) *in vitro*;
4. Avaliação da atividade anti-inflamatória do (FAEHA) *in vitro*;
5. Determinação da concentração de saponinas e detecção das sapogeninas no FAEHA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica em Bioprodutos (Fitotec), em parceria com o Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, responsável pelo Laboratório de Genética e Terapia Celular (Gente Cel). Ambos os laboratórios pertencem ao Departamento de Biotecnologia da FCL/Unesp, campus de Assis. Também, para a detecção das sapogeninas foi estabelecida uma parceria com a Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp (Campinas, SP).

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, com 50 dias de idade. Os animais permaneceram alojados no Biotério da FCL/Unesp, campus de Assis, sendo mantidos em condições-padrão de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12h ciclo claro/escuro). Os recursos alimentar e hídrico foram fornecidos *ad libitum*. O manejo dos animais obedeceu aos “*Princípios Éticos na Experimentação Animal*” definidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Os procedimentos experimentais somente ocorreram após apreciação e aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCL/Unesp, campus de Assis – Processo nº 002/2018.

2.2 Material de origem vegetal

O suco bruto de sisal foi obtido por meio da prensagem e filtração da mucilagem resultante do desfibramento de suas folhas. A mucilagem foi fornecida pelos produtores rurais do município de Valente, Bahia, Brasil. O processo de obtenção do suco foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica em Bioprodutos (Fitotec) do Departamento de Biotecnologia da FCL/Unesp, campus de Assis.

2.3 Preparação do extrato do sisal (FAEHA)

Para obtenção do FAEHA, foi utilizado o protocolo de Peana et al., 1997 com modificações. O suco natural do sisal foi inicialmente submetido ao ácido sulfúrico

(Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) até obtenção do pH 0,4-0,8 e aquecido a alta temperatura (120°C) por 150 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi centrifugada e o precipitado obtido foi seco em estufa a 50°C (SL-100/81, Solab, Piracicaba, SP, Brasil).

Em uma etapa seguinte, 10 gramas do precipitado foram dissolvidos em 100 mL de etanol hidratado a 95% (Anidrol, Diadema, SP, Brasil). A solução foi agitada por 30 minutos, filtrada e submetida a rotoevaporação (Fisatom, modelo 803, São Paulo, SP, Brasil) para retirada do etanol 95%. O extrato obtido foi seco em estufa (SL – 100/81, Solab, Piracicaba, SP, Brasil) a 37°C por cerca de 7 dias até obtenção de peso constante. O FAEHA foi dissolvido em solução fisiológica.

2.4 Obtenção de células mononucleares do sangue total humano (*Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC*)

A obtenção das PBMC se deu por meio do sangue total que foi fornecido pelo Laboratório de Análises Clínicas Bioanálise, da cidade de Cândido Mota (SP). Este laboratório participa em programas de qualidade como o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). As amostras que foram doadas correspondiam às sobras de sangue humano total que seriam descartadas após a realização das análises pelo Laboratório de Análises Clínicas. Foram selecionados materiais de 12 pacientes hígidos, de ambos os sexos, entre 25 e 35 anos que não faziam uso de anti-inflamatórios e substâncias tóxicas. Os pacientes foram informados sobre o reaproveitamento do sangue e autorizaram o uso por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A realização dos testes com sangue humano ocorreu após apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista (FCL/Unesp), campus de Assis, sob o número de registro CAAE: 14382719.4.0000.5401.

Para a extração de PBMC, foi utilizada a metodologia de separação em gradiente descontínuo de densidade e o reagente Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O sangue total de humanos foi armazenado em tubos de EDTA (Labor Import, Osasco, SP, Brasil) e transferido cuidadosamente para um tubo Falcon contendo Histopaque 1077. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 400g por 30 minutos, para que ocorresse a separação das frações por diferença de densidade. A

névoa que se formou entre o Histopaque e o plasma foi coletada e lavada com PBS para a obtenção de PBMC. (QABAHA et al., 2016).

A partir da PBMC, foram confeccionadas três lâminas. O material foi fixado com metanol e corado com o emprego da coloração de Wright (Impex, Varginha, MG, Brasil). Após a coloração, as lâminas foram montadas utilizando-se Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) para visualização no microscópio óptico binocular (Olympus, Tóquio, Japão).

2.5 Testes de toxicidade *in vitro*

Os testes de toxicidade foram realizados com as PBMC obtidas do sangue total humano, em sua maioria triplicata, exceto o teste de exclusão do Azul de Trypan (quintuplicata), todos em uma única ocasião. As PBMC são amplamente utilizadas em estudos que avaliam os efeitos tóxicos de novos compostos químicos, medicamentosos e imunoterápicos (ST PIERRE *et al.*, 2017; POURAHMAD; SALIMI, 2015).

Os grupos utilizados nos testes toxicológicos estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos grupos para os testes toxicológicos de Teste do MTT (tempo 24, 48 e 72 horas), Teste de exclusão do azul de Trypan (24 horas) e Ensaio de incorporação do vermelho neutro (24 horas)

Grupos	Tratamentos – Concentração final
Controle Negativo	Solução fisiológica - Cloreto de sódio 0,9% (LBS, Laborasa, São Paulo, SP, Brasil)
Controle Positivo	Tween 80 (Impex, Varginha, MG, Brasil) a 0,01% diluído em solução fisiológica
FAEHA em meio de cultura	0,5 mg/mL
FAEHA em meio de cultura	1,0 mg/mL
FAEHA em meio de cultura	2,0 mg/mL

Fonte: A autora (2020).

2.5.1 Teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações (TSUBOY *et al.*, 2010). As PBMC na concentração

de $2,0 \times 10^6$ células/mL foram diluídas em meio RPMI 1640 (LGC, Osasco, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (LGC, Osasco, SP, Brasil) e 1% Penicilina-Anfotericina (LGC, Osasco, SP, Brasil) e Gentamicina (LGC, Osasco, SP, Brasil). As células submetidas aos diferentes tratamentos foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas para os respectivos tratamentos (Tabela 1) a 37°C a 5% de CO₂ (Panasonic, modelo MCO-19AIC-PA, EUA). Após o término dos três diferentes tempos de tratamento, o meio foi retirado e foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL(p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em todos os poços. Em seguida, a placa foi incubada por 4h a 37°C, 5% CO₂. Após este período, o MTT foi descartado e foi adicionado DMSO (LGC, Osasco, SP, Brasil) em todos os poços para solubilização dos cristais de formazan. Na sequência, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de Elisa Multiskan FC Thermoscientific® a 560nm. As amostras foram realizadas em triplicata.

O cálculo da viabilidade celular foi realizado segundo a fórmula:

$$VC = (Abs A / Abs CN) * 100$$

Onde: VC = Viabilidade celular (%)

Abs A = absorbância da amostra

Abs CN = absorbância do controle negativo

2.5.2 Teste de exclusão do azul de Trypan

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Phillips (1973), com modificações. As PBMC foram diluídas na densidade celular de 1×10^6 células/mL em meio DMEM *high glucose* (LGC, Osasco, SP, Brasil), 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina-Estreptomicina, 1% de Anfotericina. Células e extratos foram distribuídos em placa de 96 poços e incubados a 37°C em estufa 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse tempo, uma alíquota da suspensão de células foi retirada, diluída em azul de Trypan 0,04% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e contada em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram aspecto translúcido e as células mortas, uma coloração arroxeadada. A densidade de células viáveis (células/mL) foi expressa como a Média \pm EPM (Erro Padrão Médio). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, em razão do tempo (24h). O experimento foi realizado em quintuplicata. O cálculo da viabilidade celular foi realizado segundo a fórmula:

$$VC (\%) = NCV / NTC * 100$$

Onde: VC = Viabilidade celular (%)

NCV = Número de células viáveis (não coradas) nos quatro quadrantes

NTC = Número total de células (coradas e não coradas) nos quatro quadrantes

2.5.3 Ensaio de incorporação do vermelho neutro

Este teste foi realizado conforme método descrito por Borenfreund com modificações (BORENFREUND; PUERNER, 1985). As PBMC isoladas do sangue total foram cultivadas no meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma associação de antibióticos contendo Penicilina 1% e Estreptomicina 1% e Gentamicina 50 µg/mL, e antifúngico Anfotericina 1%. As PBMC foram diluídas na concentração $2,0 \times 10^6$ células/mL e incubadas com os tratamentos por 24 horas a 37°C sob 5% de CO₂.

Após este período de incubação, o meio contendo o extrato foi removido e o poço foi lavado com PBS (LGC, Brasil). O corante vital vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi então adicionado à cultura e a placa foi incubada por mais 3 horas. Imediatamente após a incubação, o cristal formado foi solubilizado com solução aquosa de 50% de etanol e 1% de ácido acético. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Multiskan FC Thermoscientific®) a 540nm.

O cálculo da viabilidade celular foi realizado segundo a fórmula:

$$VC = (Abs A / Abs CN) * 100$$

Onde: VC = Viabilidade celular (%)

Abs A = absorbância da amostra

Abs CN = absorbância do controle negativo

2.6 Ensaio da atividade anti-inflamatória *in vitro*

Esses testes foram realizados com macrófagos obtidos do peritônio de camundongos. Os grupos utilizados para os testes anti-inflamatórios estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos grupos para os testes anti-inflamatórios Teste da fagocitose, Retenção de lisossomos e Espriamento de macrófagos

Grupos	Tratamentos – concentrações finais
Controle Negativo	Solução fisiológica - Cloreto de sódio 0,9% (LBS, Laborasa, São Paulo, SP, Brasil)
Controle Positivo	Cetoprofeno (Medley, Campinas, SP, Brasil) - diluído em solução fisiológica a 1,0 mg/mL
FAEHA em meio de cultura	0,5 mg/mL
FAEHA em meio de cultura	1,0 mg/mL
FAEHA em meio de cultura	2.0 mg/mL

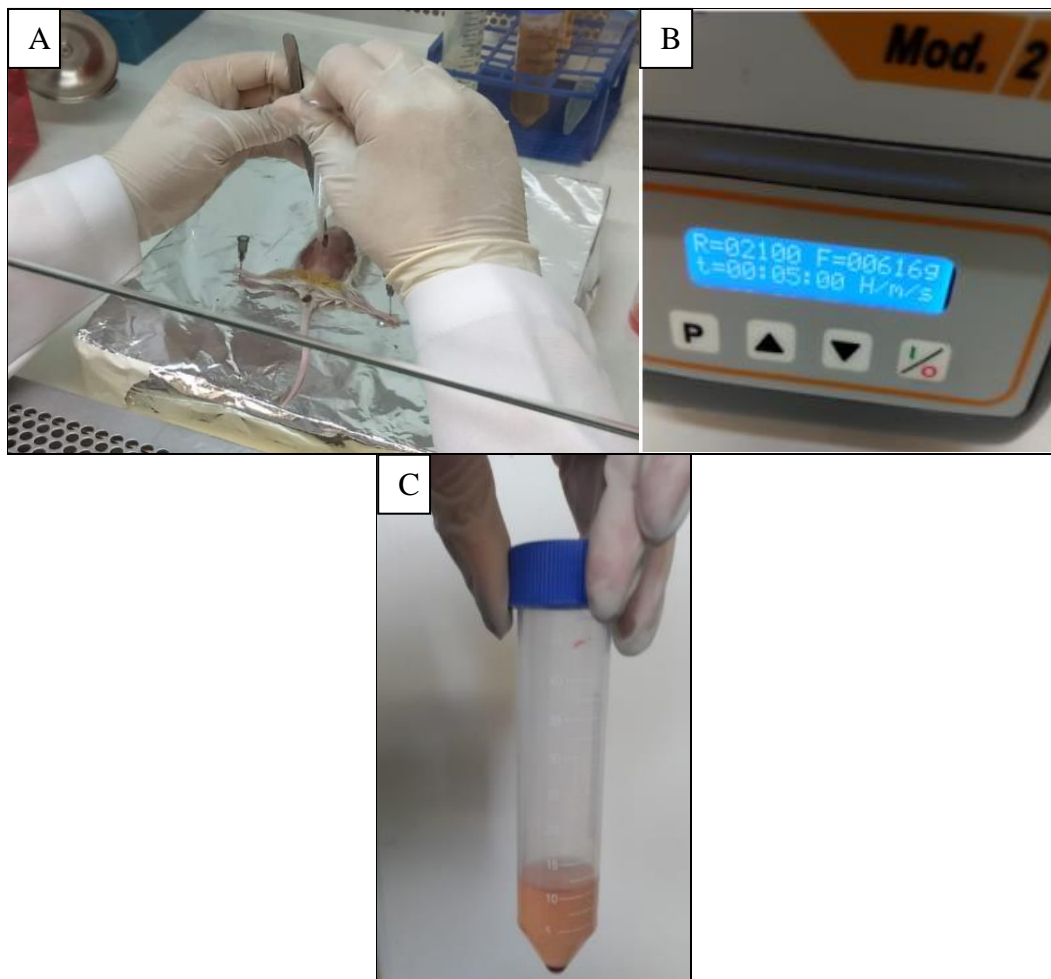
Fonte: A autora (2020).

2.6.1 Obtenção de macrófagos de camundongos

As células obtidas nestes ensaios foram retiradas camundongos fêmeas *Swiss*. Para obtenção deste fluido foi utilizado o protocolo modificado do trabalho de Araújo-Jorge e De Souza (1986 *apud* BARBOSA; PEREIRA; MEIRELLES, 2000).

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os pelos foram removidos e a região abdominal foi limpa com álcool 70% e Povidine (PVPI) (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). O abdômen foi aberto com instrumentos cirúrgicos, o peritônio foi exposto, conforme Figura 1. Foi injetado PBS gelado (LGC, Osasco, SP, Brasil) e o lavado do líquido peritoneal foi retirado. Foram feitos esfregaços em lâmina em triplicata. Após essas etapas, o líquido de lavado peritoneal foi centrifugado.

Figura 1 - Obtenção de líquido de lavado peritoneal de camundongos em alguns momentos: (A) extração do lavado de líquido peritoneal com pipeta Pasteur, (B) centrifugação do lavado do líquido peritoneal, (C) lavado do líquido peritoneal após a centrifugação



Fonte: A autora (2020).

Após a confecção de esfregaços do lavado do líquido peritoneal, as lâminas foram coradas pelo método de Wright (Impex, Varginha, MG, Brasil). As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão). Foi realizada a identificação morfológica e contagem diferencial das células.

2.6.2 Seleção dos macrófagos

A seleção dos macrófagos foi realizada por adesão, processo que permite obter culturas em monocamada de células aderentes. As células contidas no lavado peritoneal foram contadas na Câmara de Neubauer. As células foram diluídas em

meio DMEM *high glucose*, 10% soro fetal bovino, 1% de Penicilina - Estreptomicina e 1% Anfotericina, de forma a atingir a concentração desejada de $2,0 \times 10^6$ células/mL (PIEMONTE; BUCHI, 2002).

2.6.3 Teste da fagocitose em cultura de macrófagos

O teste foi realizado em cultura de macrófagos conforme o método descrito por Pipe, Coles e Farley (1995). Foram depositados 100 μ L de células, com concentração $2,0 \times 10^6$ células/mL em placa de ELISA e foram adicionados 10 μ L de cada tratamento incubado por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de solução de zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL), corado com vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubado por mais 30 minutos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando 100 μ L de solução de extração. Após 30 minutos, foi realizada a leitura das placas, a 550 nm utilizando leitora de ELISA Multiskan FC Thermoscientific®. Este teste foi realizado em triplicata.

A taxa de inibição da fagocitose foi calculada por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição da fagocitose} = (Média \text{ Abs CN} - Média \text{ Abs A} / Média \text{ Abs CN}) * 100$$

Onde: Média Abs CN = média da absorbância do controle negativo

Média Abs A = média da absorbância da amostra

2.6.4 Retenção de lisossomos

A retenção foi realizada em cultura de macrófagos, de acordo com o método descrito por Pipe, Coles e Farley (1995). Em 100 μ L da solução peritoneal contendo 2×10^6 células de macrófagos/mL foram adicionados 10 μ L de solução de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) e incubados por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com os extratos e controles por 30 minutos. Na sequência, foram adicionados 20 μ L de solução de vermelho neutro. Após a centrifugação, as células lavadas com solução de PBS uma única vez e posteriormente, foi adicionado solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos e por fim, foi realizada a leitura em ELISA no comprimento de onda de 490nm. Este teste foi realizado em triplicata. Foi calculada a taxa de inibição por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição da retenção de lisossomos} = \frac{(\text{Média Abs CN} - \text{Média Abs A})}{\text{Média Abs CN}} * 100$$

Onde: Média Abs CN = média da absorbância do controle negativo

Média Abs A = média da absorbância da amostra

2.6.5 Espreadimento de macrófagos

Para o espreadimento de macrófagos foi usado o método descrito por Sampaio *et al.* (2001), com modificações. Alíquotas de 100 μL de cada suspensão celular do lavado peritoneal a $5,0 \times 10^5$ células/mL, cultivada em meio DMEM *high glucose*, 10% de soro fetal bovino e 1% de Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina foram distribuídas sobre lâminas de vidro e deixadas em repouso por 15 minutos a 25°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com solução salina estéril para a remoção das células não aderidas e, então incubadas durante 1 hora à temperatura de 37°C em uma solução contendo 100 μL do meio DMEM *high glucose* e 10 μL dos diferentes tratamentos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em solução salina estéril e as células aderidas foram fixadas com solução de Glutaraldeído a 2,5% (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) por 5 minutos. Após a fixação, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Os macrófagos foram fixados novamente com Entellan para o processo de montagem da lâmina permanente. Uma vez prontas, as lâminas foram lidas em microscópio óptico em aumento de 400x, realizando uma contagem total de 100 células e determinados o número e a porcentagem de inibição dos macrófagos espreados (SAMPAIO *et al.*, 2001).

Para calcular a porcentagem de inibição do espreadimento foi realizado o seguinte cálculo:

$$\% \text{ inibição do espreadimento} = \frac{\%EC - \%ET}{\%EC} \times 100\%$$

Sendo: % ET = porcentagem de espreadimento do grupo tratado.

% EC = porcentagem de espreadimento do grupo controle (PERES; CURI, 2005).

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.7 Determinação das concentrações de saponinas e sapogeninas

A fim de se avaliar a relação dos efeitos anti-inflamatórios do extrato com a presença de saponinas, este metabólito foi avaliado mediante análise espectrofotométrica, de acordo com as recomendações da literatura (VIGO; NARITA; MARQUES, 2003).

A análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi adicionada em 1 mL do reagente cromogênico cloreto de cobalto 0,2% (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) e 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. A leitura da solução ocorreu em 284 nM após 20 minutos do início da reação para verificação das absorvâncias. Como padrão positivo foi empregada a saponina padrão (Merck, Darmstadt, Alemanha) solubilizada em água na concentração de 0,3 mg/ml.

A detecção das sapogeninas presentes no extrato foi realizada por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Este procedimento foi realizado em parceria com a pesquisadora Elaine C. Cabral da Divisão de Química de Produtos Naturais (CPQBA / Unicamp).

Nesta análise, o extrato (aproximadamente 10 mg) foi dissolvido em 1 mL de metanol (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) e 10 µL desta solução foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1) com 0,1 % de ácido fórmico (99%) (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil). A solução da amostra foi injetada por inserção direta via bomba seringa no espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram adquiridos no modo positivo de ionização; os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* 150 a 1800 e os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos em *m/z* 50 até um valor pouco acima do íon em estudo e com energia de colisão de 10 - 40 eV.

As condições gerais de operação do espectrômetro foram: voltagem do spray de 3500 V, temperatura do capilar de 320 C, pressão do sheat gas de 10 psi e nível de RF da S-Lens de 50 V.

Os espectros foram tratados com o *software* Xcalibur 2.1.0 (Thermo Scientific, Alemanha), específico do espectrômetro de massas.

2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos por média \pm EPM (Erro Padrão Médio). As análises estatísticas foram realizadas por intermédio do *software* BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Tefe, AM, Brasil). Em todos os testes o nível de significância foi de 5%.

Para todos os testes (ensaio de incorporação do vermelho neutro, teste da fagocitose, retenção de lisossomos e espraiamento de macrófagos), os dados foram submetidos à ANOVA *one-way*, tendo como fator independente o tratamento, exceto para o teste do MTT, cujos dados foram submetidos a ANOVA *two-way*, tendo como fatores independentes o tratamento e o tempo. Quando apropriado, foram realizadas teste *post-hoc* de Tukey

No teste de exclusão do azul de Trypan, como a normalidade não foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo, entretanto, o cultivo de sisal passa por um período de declínio e desvalorização, em razão da concorrência com as fibras sintéticas, que são mais baratas, e o baixo índice de aproveitamento da planta. Isto porque, como já mencionado, a fibra dura corresponde somente de 3 a 5% do peso da folha do sisal, sendo o restante descartado como mucilagem durante o processo de desfibramento (YISHUO *et al.*, 2018; ARALDI *et al.*, 2018).

Desta forma, a realização de estudos científicos com a mucilagem descartada do sisal e o desenvolvimento de produtos de interesse para a indústria farmacêutica podem promover uma mudança de projeção com a reiteração do valor social e econômico desta planta. Ao agregar valor ao resíduo do sisal, por meio do comércio de produtos desenvolvidos com este material, poderia ser viabilizada uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil, uma das mais pobres do país, onde os pequenos produtores rurais dificilmente alcançam uma renda mensal de um salário mínimo (CARDOSO, 2019).

Nesta direção, considerando que para a aprovação de um medicamento no Brasil é necessária a realização de uma série de testes *in vivo* e *in vitro*, que comprovem sua eficácia e segurança (SIMÕES *et al.*, 2010), este estudo visa complementar, por meio de métodos realizados *in vitro*, alguns resultados anteriormente obtidos *in vivo* com o extrato desenvolvido pelo resíduo do sisal.

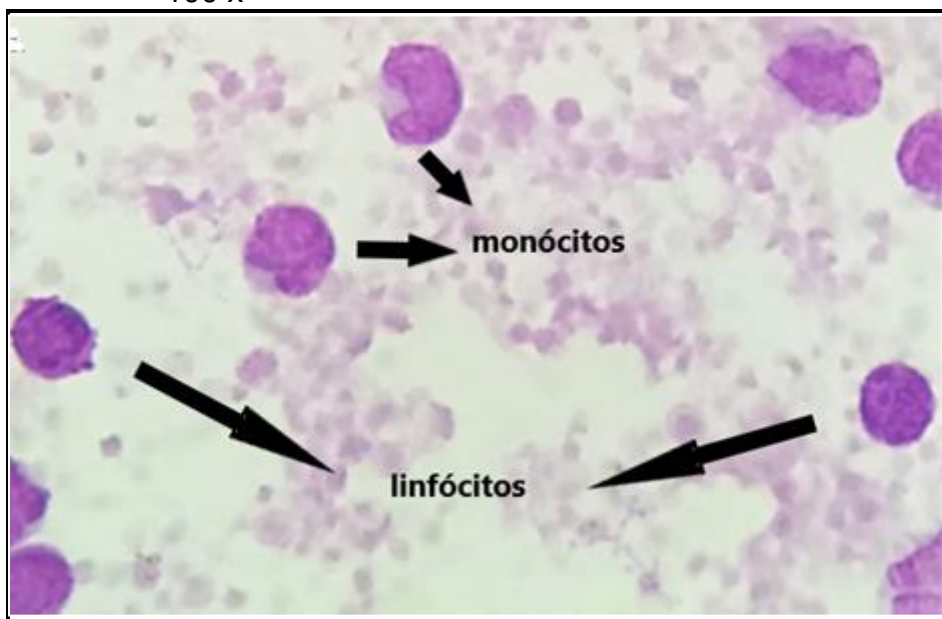
Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados seguindo a ordem cronológica de sua execução.

3.1 Obtenção de células mononucleares do sangue total humano (*Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC*)

Na realização dos testes toxicológicos *in vitro* foram utilizadas células mononucleares de sangue total humano pelo fato de serem largamente empregadas nos testes toxicológicos de novos medicamentos (ST PIERRE *et al.*, 2017; POURAHMAD; SALIMI, 2015). Estudos têm demonstrado que os medicamentos que comprometem a viabilidade das PBMC podem eventualmente causar efeitos colaterais sérios e fatais ao organismo (POURAHMAD; SALIMI, 2015).

A Figura 2 mostra as PBMC (linfócitos e monócitos) que foram obtidas após o processo de separação do sangue humano. A visualização dessas células se deu em microscópio óptico binocular. No processo de coloração foi utilizado o método de Wright.

Figura 2 - Células PBMC obtidas do sangue humano – em lâmina - coloração de Wright – aumento de 100 x



Fonte: A autora (2020).

3.2 Determinação de toxicidade *in vitro*

O estudo da toxicidade *in vitro* tem sido usado para definir o efeito tóxico de inúmeras substâncias, bem como permitir a identificação dos prováveis danos promovidos nas células (EISEMBRAND et al., 2002). Além disso, esses ensaios permitem estimar a dose inicial a ser usada em testes de toxicidade *in vivo* (VALADARES, 2006). Desta forma, a viabilidade celular das PBMC foi avaliada após o tratamento com o FAEHA, por três métodos já estabelecidos no meio científico. As metodologias testadas foram: teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; teste de exclusão do azul de Trypan; e ensaio de incorporação do corante vermelho neutro.

3.2.1 Resultados obtidos no teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

O teste de citotoxicidade *in vitro* pelo MTT foi realizado para avaliar se o FAEHA poderia interferir nas estruturas mitocondriais e, conseqüentemente, na viabilidade celular das PBMC. Neste teste, a reação para a formação do cristal de formazan só ocorre em células viáveis, com atividade mitocondrial preservada. O grupo controle negativo foi convencionado como 100% de viabilidade celular em 24 horas, 48 horas e 72 horas após incubação.

O teste da ANOVA *two-way* mostrou efeito significativo dos tratamentos ($F = 52,2723$, $p < 0,0001$), o que não ocorreu com o tempo ($F = 1,2741$, $p = 0,2908$).

O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que após 24 horas de incubação, o FAEHA na concentração 2,0 mg/mL reduziu de forma significativa a viabilidade celular das PBMC para $70,17\% \pm 0,70$, quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$). As concentrações 0,5 e 1,0 mg/mL apresentaram viabilidade celular acima de 100% ($146,50\% \pm 0,03$ e $116,83\% \pm 2,90$, respectivamente), mas somente a concentração 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC quando comparada ao controle negativo (Tabela 3).

No tempo de 48 horas após a incubação das células com os tratamentos, o teste *post-hoc* de Tukey mostrou que a concentração 2,0 mg/mL causou diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular ($89,00\% \pm 0,44$). Obtiveram valores de viabilidade celular maiores que 100% as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL ($114,62\% \pm 2,44$ e $101,27\% \pm 4,00$, respectivamente). Neste tempo, novamente, somente a concentração 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC quando comparada ao controle negativo (Tabela 3).

Em 72 horas, o teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que o FAEHA na concentração 2,0 mg/mL não diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) a taxa da viabilidade celular das PBMC ($92,62\% \pm 3,48$). As concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL obtiveram viabilidade celular acima de 100%, $123,47\% \pm 2,56$ e $119,45\% \pm 2,81$, respectivamente. De forma similar aos outros tempos analisados, somente a concentração 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC quando comparada ao controle negativo (Tabela 3).

O grupo controle positivo, Tween 80, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC em todos os tempos analisados (Tabela 3).

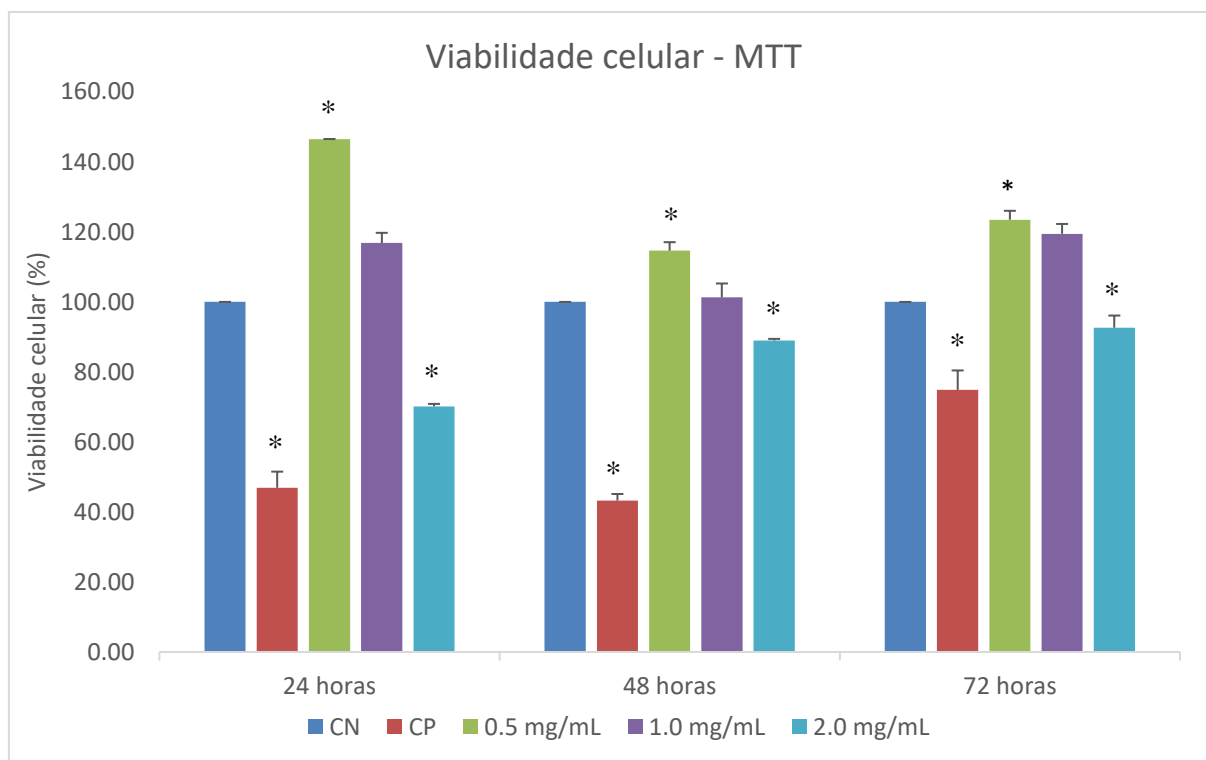
Tabela 3 - Média (%) \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste do MTT para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN - Controle Negativo – solução fisiológica, CP - Controle Positivo - Tween 80 0,01% diluído em solução fisiológica e FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL.

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas
CN	100,00 \pm 0	100,00 \pm 0	100,00 \pm 0
CP	46.91 \pm 4.62*	43.24 \pm 1.90*	74.87 \pm 5.55*
0,5 mg/mL	146.50 \pm 0.03*	114.62 \pm 2.44*	123.47 \pm 2.56*
1,0 mg/mL	116.83 \pm 2.90	101.27 \pm 4.00	119.45 \pm 2.81
2,0 mg/mL	70.17 \pm 0.70*	89.00 \pm 0.44*	92.62 \pm 3.48*

* Valores significativos para $p < 0,05$. – ANOVA *two-way* seguido do teste *post-hoc* de Tukey
 Fonte: A autora (2020).

Resumindo, o FAEHA 0,5 mg/mL aumentou a sua taxa de viabilidade celular em todos os tempos analisados. O FAEHA 1,0 mg/mL não interferiu taxa de viabilidade celular em todos os tempos analisados. O FAEHA 2,0 mg/mL reduziu a viabilidade celular em todos os tempos analisados.

Figura 3 - Média \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste do MTT para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *two-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.



* Valores significativos para $p < 0,05$.

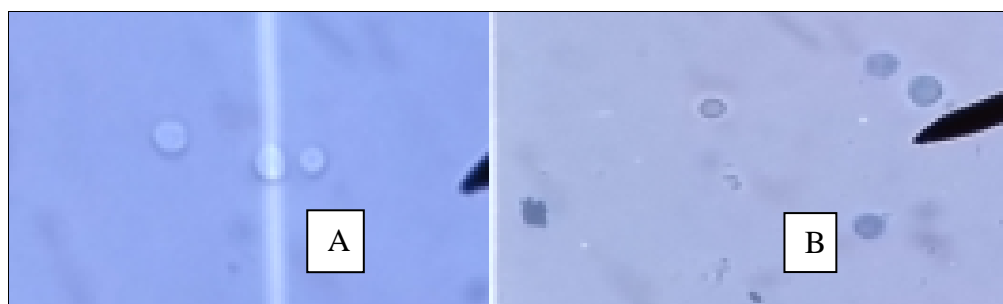
Fonte: A autora (2020).

3.2.2 Resultados obtidos no teste de exclusão do azul de Trypan

O teste de exclusão do azul de Trypan teve como objetivo avaliar se o FAEHA poderia interferir na permeabilidade celular das PBMC no tempo de 24 horas, visto que, neste tempo, no teste do MTT, os grupos controle positivo, 0,05 mg/mL e 2,0 mg/mL diferiram significativamente do controle negativo e mostraram um perfil bem claro da influência dos tratamentos sobre a viabilidade celular. O controle negativo foi padronizado como tendo viabilidade celular de 100%.

Neste teste, as células viáveis apresentaram a membrana celular preservada e não se coraram de azul (Figura 4 A), ao passo que as células não viáveis tiveram a membrana celular rompida e se coraram de azul (Figura 4 B).

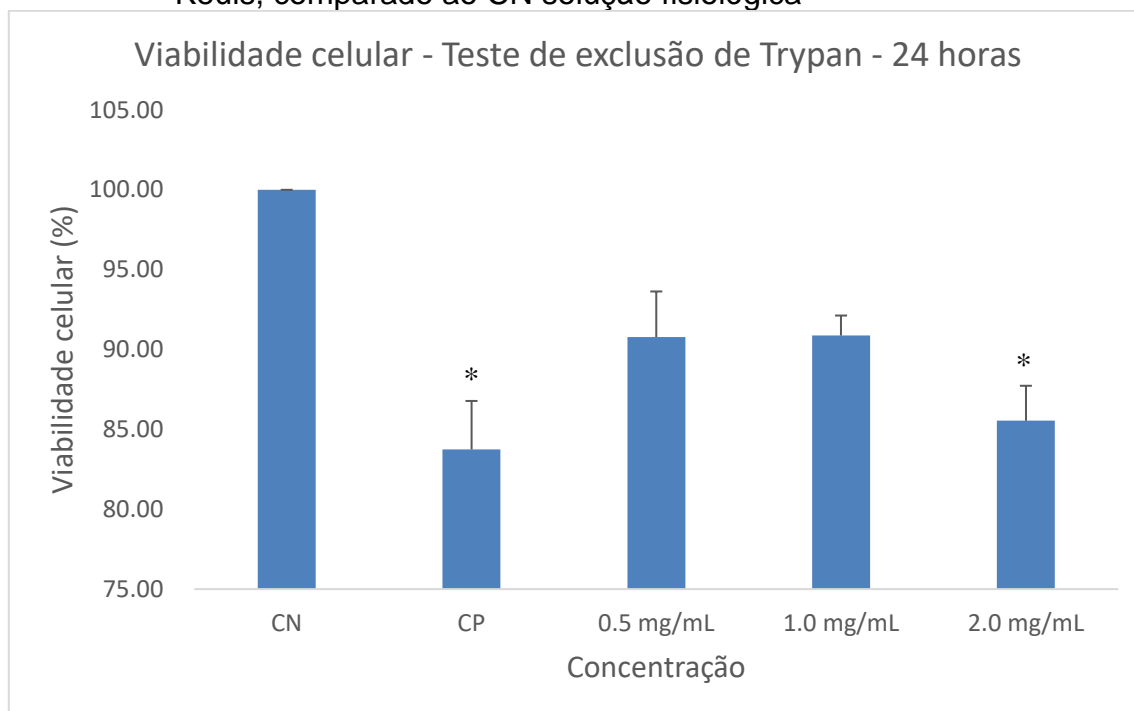
Figura 4 - Células viáveis que não foram coradas com azul de Trypan (A) e células não viáveis que se coraram com azul de Trypan (B). A visualização dessas células se deu em microscópio óptico binocular, a contagem foi realizada na câmara de Neubauer – aumento 400x.



Fonte: A autora (2020).

A distribuição de normalidade foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos, Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls foram utilizados para realizar a análise estatística. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls indicou que não houve diferença significativa na viabilidade celular das PBMC tratadas com o FAEHA 0,5 e 1,0 mg/mL, quando comparados ao controle negativo ($p > 0,05$), após 24 horas de incubação. Esses resultados indicam que estas concentrações não interferiram na taxa de viabilidade celular. Por outro lado, o controle positivo Tween 80 e o FAEHA 2,0 mg/mL reduziram significativamente ($p < 0,05$) a taxa de viabilidade celular (Figura 5), quando comparados ao controle negativo. Considerando que os valores de viabilidade celular das concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL ($90,78\% \pm 2,86$, $90,88\% \pm 1,25$, $85,54 \pm 2,19$, valores de média \pm EPM), respectivamente) e não apresentou viabilidade celular menor que 70%, o FAEHA não é considerado tóxico.

Figura 5 - Média \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste de exclusão do Azul de Trypan, para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. Teste de Kruskal-Wallis, seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls, comparado ao CN solução fisiológica



* Valores significativos para $p < 0,05$.
Fonte: A autora (2020).

3.2.3 Resultados obtidos no ensaio de incorporação do vermelho neutro

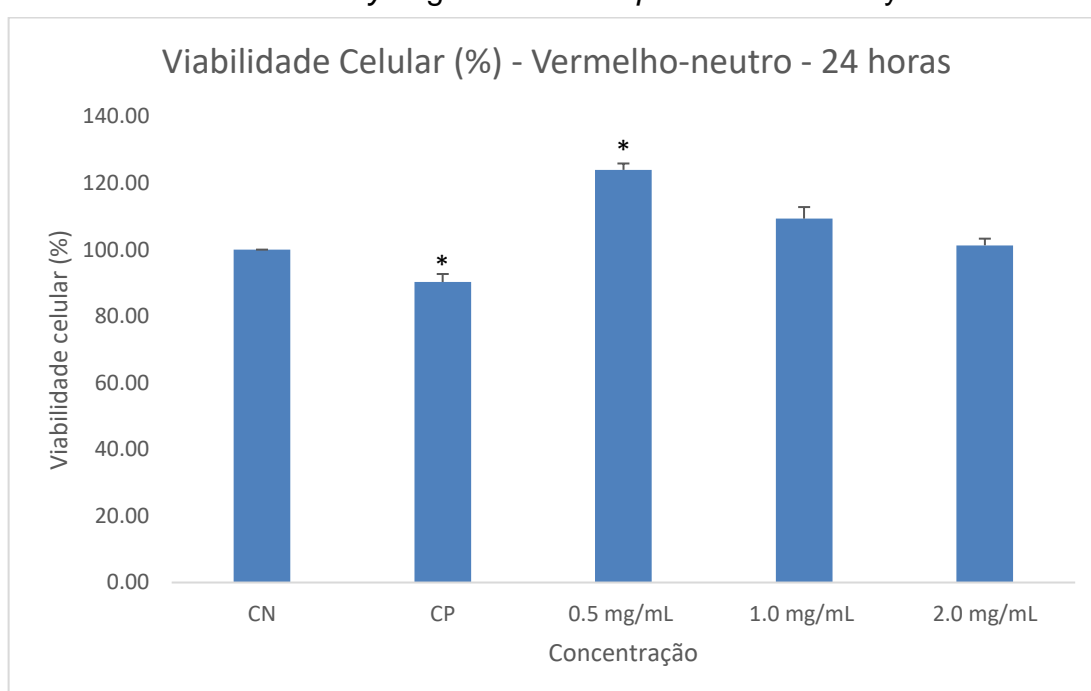
O ensaio de incorporação do vermelho neutro tem a finalidade de avaliar se o FAEHA poderia interferir na viabilidade celular das PBMC. Isto porque, por ligações eletrostáticas entre o corante vermelho neutro e os componentes da membrana celular de lisossomos, o corante fica retido no interior desta organela em células viáveis, o que garante a cor vermelha. Em células inviáveis, esta interação não acontece.

Neste teste, em todas as concentrações de FAEHA analisadas – 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL – os valores de viabilidade celular foram acima de 100%, após 24 horas de incubação, cujos valores obtidos foram $123,95\% \pm 1,92$, $109,30\% \pm 3,48$ e $101,29\% \pm 2,00$, respectivamente.

A análise de ANOVA *one-way*, seguida de teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que o FAEHA, 1,0 e 2,0 mg/mL, não apresentou diferenças significativas em relação

ao controle negativo, ou seja, nestas concentrações o extrato não afetou a viabilidade celular ($p>0,05$). Por outro lado, o controle positivo, Tween 80, reduziu de forma significativa a viabilidade celular ($p<0,05$), e o FAEHA 0,5 mg/mL promoveu um efeito contrário, aumentando-a significativamente, sempre em relação ao controle negativo (Figura 6).

Figura 6- Média \pm EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no ensaio de incorporação do vermelho neutro para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo, CP – Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

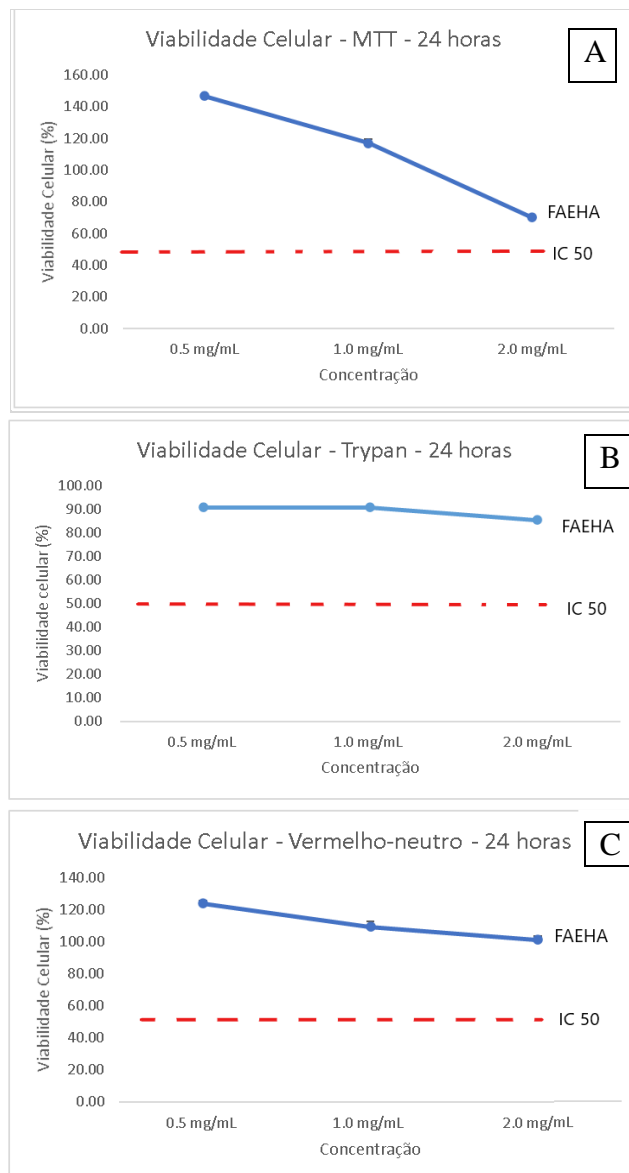


* Valores significativos para $p<0,05$.

Fonte: A autora (2020).

Considerando que a ISO 10993 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009) estabelece que um extrato é considerado citotóxico quando promove uma redução de viabilidade celular maior que 30%, uma comparação foi realizada no tempo de 24 horas entre os três métodos usados para avaliar a citotoxicidade sobre as células PBMC (Figura 7). Em complemento, é possível constatar que nos três testes o FAEHA, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, não promoveu 50% de inibição da viabilidade celular, conseqüentemente, não foi possível determinar neste estudo a concentração inibitória mediana (IC50) deste extrato.

Figura 7 - Viabilidade celular em população de PBMC após tratamento de 24 horas com o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, determinado por teste de MTT (A), teste de exclusão do Trypan (B), ensaio de incorporação de vermelho neutro (C).



Fonte: A autora (2020).

3.2.4 Discussão dos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade

Inicialmente, avaliando os dados de toxicidade *in vitro*, foi estabelecida uma comparação entre os dados obtidos nos testes *in vitro* (MTT, teste de exclusão do Azul de Trypan e ensaio de incorporação do vermelho neutro) com os que foram obtidos anteriormente com o mesmo extrato no teste *in vivo* da toxicidade aguda.

No teste da toxicidade aguda, realizado *in vivo*, com ratos *Wistar*, em estudo ainda não publicado, a dose única de 2000 mg/kg de peso corporal, também avaliada

durante um período de 24 horas, não foi letal aos animais. De acordo com o guia de toxicidade aguda da Comunidade Comum Europeia (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2002), somente as substâncias que apresentam uma Dose Letal Mediana (DL 50) de 0,2 a 2000 mg/kg, quando administradas por via oral, por dose única, em ratos, são consideradas como nocivas (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2002; ANVISA, 2013). Desta forma, assim como não foi factível calcular o IC 50 nos testes *in vitro* do FAEHA, no teste de toxicidade aguda *in vivo* não foi possível determinar o valor DL50. Ou seja, a redução da viabilidade celular inferior a 30% nos testes *in vitro* e a ausência de mortes na dose de 2000 mg/kg no teste *in vivo*, se complementam e permitem sugerir que o FAEHA é considerado como não tóxico.

Em complemento, no estudo da toxicidade aguda da FAEHA *in vivo*, após 14 dias da sua administração em dose única, os animais foram sacrificados e exames anatomopatológicos macroscópicos das adrenais, fígado, estômago, rins e coração foram realizados. Os resultados mostraram que não existiram diferenças significativas nos aspectos e pesos das estruturas analisadas configurando ausência da toxicidade aguda da FAEHA.

Estabelecendo-se uma avaliação entre os dados obtidos neste estudo e os da literatura, é possível constatar a baixa toxicidade das concentrações dos extratos do sisal. Dunder *et al.* (2013), avaliando a fração hexânica do sisal sobre os fibroblastos 3T3 de camundongos BalB/C no teste do MTT, no período de 24 horas, constataram uma redução de 15% na viabilidade celular nas concentrações 250 a 500 μ M, quando comparado ao controle negativo. A ausência de citotoxicidade também foi relatada no estudo de Barreto *et al.* (2017), no ensaio de incorporação do vermelho neutro, avaliando o extrato bruto da *Agave sisalana* 0,128 mg/mL e uma fração enriquecida em polissacarídeos 0,45 mg/mL em cultura de BALB / 3T3 clone A31 (ATCC® CCL163™), linhagem permanente de fibroblastos murinos, após 2 horas de incubação.

Ao contrário, nos testes do MTT e do azul de Trypan, Botura (2011) observou que em células Vero provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) o extrato de acetato de etila (1000 μ g/mL) e a fração de saponinas (125 μ g/mL) de *Agave sisalana* após 24 horas mostrou valor de viabilidade celular de 0%. Ao passo que no tratamento com o extrato aquoso de *Agave sisalana* (1000

$\mu\text{g/mL}$) foi encontrado um percentual de 88% de células viáveis. Também Araldi *et al.* (2018), analisando vários extratos obtidos do resíduo do sisal (o que resultou do processo de hidrólise ácida - 100 $\mu\text{g/mL}$, o do precipitado seco - 500 $\mu\text{g/mL}$ e o hexânico - 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$), constataram que estes apresentaram atividade citotóxica após 48 horas em células Vero, no ensaio anexina V-PI. Entretanto, é possível observar que, nesse estudo, todos os extratos mencionados foram diluídos com Tween 80, um agente citotóxico, usado neste estudo como controle positivo nos três testes de citotoxicidade, e que provavelmente pode ter interferido nos resultados obtidos.

Vieira (2014), analisando os resíduos sólido e líquido de *Agave sisalana* em células HeLa, usando o reagente de proliferação celular tetrazólico (WST-1), observou que os extratos resultantes do resíduo líquido 0,5 mg/mL e do resíduo sólido a 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL não se mostraram citotóxicos. Ao passo que nas concentrações 5,0 mg/mL, esses mesmos extratos apresentaram citotoxicidade acima de controle positivo (células HeLa + 10 μL de DMSO). Ou seja, no trabalho desses autores, a citotoxicidade apresentou padrão dose-dependente.

Diante dos resultados encontrados na literatura, e considerando que o FAEHA não foi considerado citotóxico neste estudo por apresentar viabilidade celular maior que 70%, em todas as concentrações analisadas, nos três testes de citotoxicidade realizados, é possível sugerir que o processo de hidrólise ácida empregado no preparo possa ter favorecido esse resultado. Está descrito na literatura que o extrato de *Agave* apresenta grande quantidade de saponinas esteroidais que ao serem submetidas ao processo de hidrólise ácida perdem a cadeia de açúcar (parte hidrofílica), e conseqüentemente a característica anfipática de sua porção aglicona, responsável pela citotoxicidade e atividade hemolítica (DUNDER *et al.*, 2010; ODA *et al.*, 2000; SEGAL; SHATKOVSKY; MILO-GOLDZWEIG, 1974). Desta forma, a citotoxicidade dos extratos de sisal pode estar diretamente relacionada ao caráter anfipático das saponinas e a lipofilicidade da aglicona. Sabe-se que as saponinas possuem a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas, fosfolipídeos de membrana, o que pode levar à formação de poros e à lise celular (ARALDI *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2011). Por fim, comparando os resultados obtidos com o FAEHA nos três métodos de toxicidade realizados *in vitro* no presente trabalho, dentro das limitações do estudo, foi possível sugerir que todas as concentrações não apresentaram citotoxicidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Além disso, os valores de viabilidade

celular maiores que 100% que foram observados nos testes do MTT e do ensaio de incorporação do vermelho neutro sugerem que o FAEHA pode possuir atividade proliferativa. Desta forma, novas análises são recomendadas para se confirmar a atividade proliferativa, como estudos futuros.

3.3 Ensaios da atividade anti-inflamatória *in vitro*

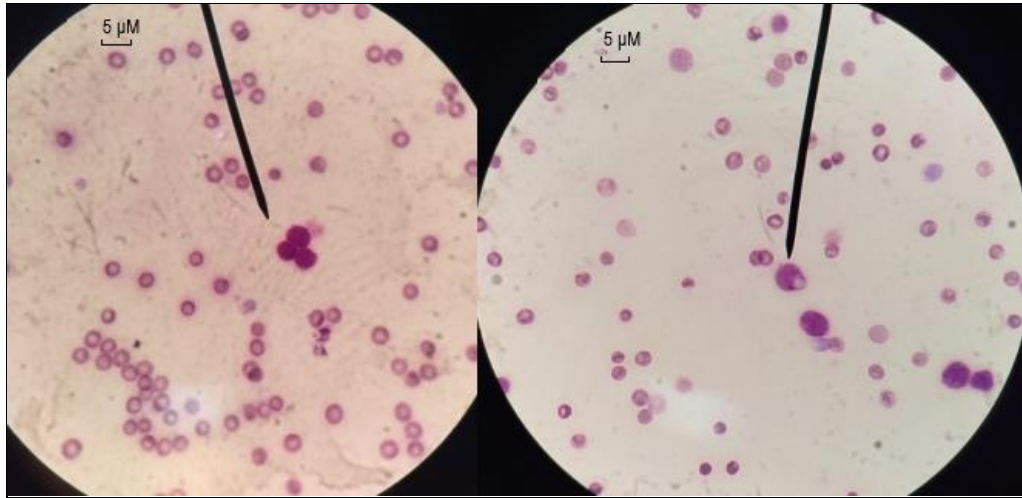
Tomando por base os resultados obtidos nos três testes de toxicidade *in vitro*, - Teste do MTT, Teste de Exclusão do Azul de Trypan e Ensaio de incorporação do vermelho neutro - os quais comprovaram ausência de toxicidade do FAEHA, ou seja, valores de viabilidade celular acima de 70%, as mesmas concentrações foram utilizadas nos testes anti-inflamatórios *in vitro*.

A célula empregada nesta etapa foi o macrófago, em virtude do papel central no processo de inflamação. Os macrófagos estão amplamente envolvidos em muitos eventos fisiopatológicos associados a esta resposta biológica, tais como no processo de fagocitose e na síntese de espécies reativas de oxigênio (óxido nítrico), os mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), fatores do complemento e enzimas proteolíticas (FENG *et al.*, 2019; ZIMMERMANN-FRANCO *et al.*, 2018).

3.3.1 Contagem diferencial de leucócitos do lavado peritoneal

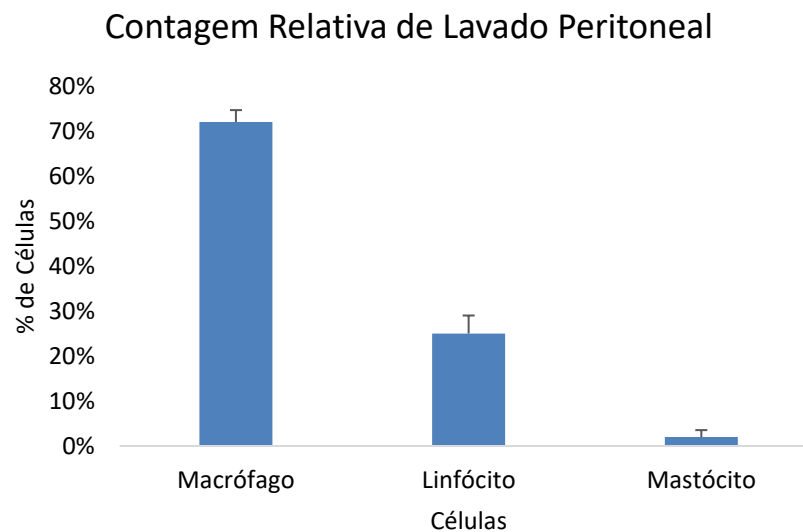
Inicialmente, o lavado peritoneal fresco obtido de camundongos foi analisado no microscópio óptico invertido. A confecção de lâminas tornou possível visualizar a morfologia em microscópio óptico binocular (Figura 8) a predominância de macrófagos (72%), seguida da presença de linfócitos (25%) e mastócitos (2%), conforme a proporção apresentada no Figura 9.

Figura 8 - Fotomicrografias do lavado peritoneal (em lâmina) expostos pela coloração de Wright, evidenciando a população de células e a presença de macrófagos (seta em preto) – aumento 100x.



Fonte: A autora (2020).

Figura 9 - Contagem diferencial das células encontradas no lavado do líquido peritoneal.



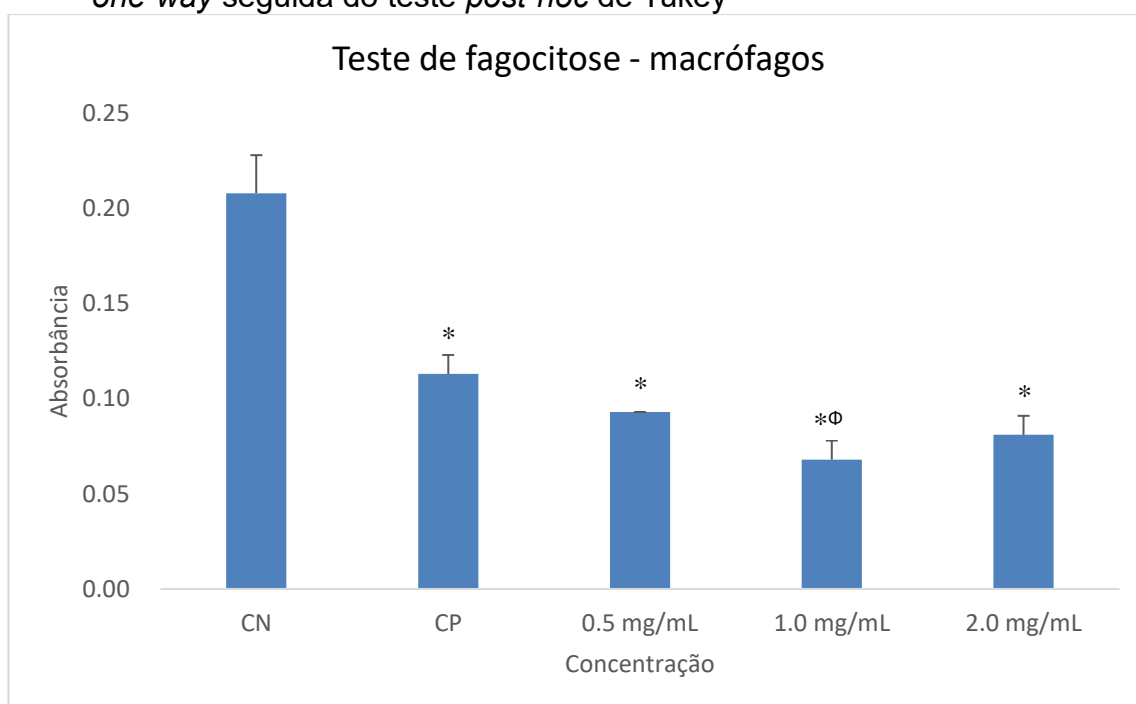
Fonte: A autora (2020).

3.3.2 Resultados obtidos no teste da fagocitose

Os resultados obtidos no teste da fagocitose com macrófagos podem ser observados no Figura 10. A ANOVA *one-way* seguida pelo *post-hoc* de Tukey demonstrou que o FAEHA, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL e o controle positivo Cetoprofeno 1,0 mg/mL, apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), indicando que esses tratamentos

inibiram o processo de fagocitose dos macrófagos, constatando-se assim a atividade anti-inflamatória dessas células. Ainda neste teste, quando comparado os valores obtidos com os tratamentos ao do controle positivo, 1,0 mg/mL diferiu significativamente ($p < 0,05$), ou seja, apresentou atividade anti-inflamatória maior do que a do controle positivo Cetoprofeno. Observa-se, também, que não há uma relação dose dependente quando se compara os valores de absorvância entre os grupos 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL ($0,09 \pm 0,00$, $0,07 \pm 0,00$ e $0,08 \pm 0,00$, respectivamente). Não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados com o FAEHA.

Figura 10 - Média \pm EPM dos valores das absorvâncias de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e a FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey



* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

Fonte: A autora (2020).

Ainda neste teste foram calculadas as taxas de inibição da fagocitose em % (Tabela 4). De forma semelhante ao verificado acima, a ANOVA *one-way* demonstrou que as três concentrações do FAEHA (0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL) que foram testadas mostraram diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), sugerindo atividade anti-inflamatória do extrato. Porém, quando esses valores foram comparados ao do controle positivo, as concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL não

apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), o que demonstra que possui efeito anti-inflamatório semelhante ao controle positivo Cetoprofeno. Somente o FAEHA 1,0 mg/mL apresentou efeito maior do que o Cetoprofeno ($p < 0,05$), visto que a taxa de inibição da fagocitose foi maior. Não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados com o FAEHA.

Tabela 4 - Média e EPM dos valores de inibição de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste da fagocitose. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Parâmetro	CN	CP	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	2,0 mg/mL
% da taxa de inibição	0	45,23*	56,66*	64,70 * ^Φ	61,81*
EPM	0	6,27	5,83	4,65	1,80

* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

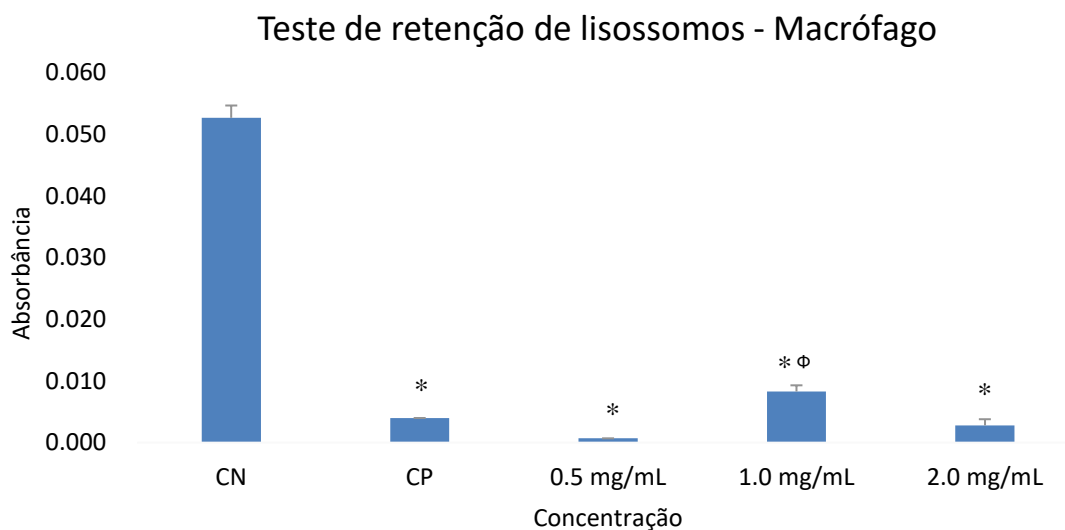
^Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

Fonte: A autora (2020).

3.3.3 Resultados obtidos no teste de retenção de lisossomos

Neste teste a análise dos dados por meio da ANOVA *one-way* seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey mostrou que o controle positivo – Cetoprofeno 1,0 mg/mL – e o FAEHA, em todas as concentrações analisadas, diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle negativo (Figura 11), indicando uma resposta anti-inflamatória. Como foi observado no teste da fagocitose, as absorbâncias do teste de retenção de lisossomos não apresentam relação dose-dependência nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL ($0,001 \pm 0,000$, $0,008 \pm 0,000$ e $0,003 \pm 0,000$, respectivamente). Além disso, o FAEHA 0,5 mg/mL diferiu significativamente de 1,0 mg/mL e este apresentou diferença estatística do grupo 2,0 mg/mL ($p < 0,05$). Também, a concentração 0,5 mg/mL e 2,0 mg/mL não diferiram estatisticamente do grupo controle positivo ($p > 0,05$).

Figura 11 - Média \pm EPM dos valores das absorbâncias de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.



* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

Fonte: A autora (2020).

Também, no teste de retenção de lisossomos, a ANOVA *one-way* demonstrou que as taxas de inibição apresentadas pelo FAEHA nas três concentrações analisadas – 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL diferiram significativamente em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), o que sugere atividade anti-inflamatória. Quando comparado ao controle positivo, somente o FAEHA 1,0mg/mL apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), inferindo que este possui efeito menor do que o Cetoprofeno. Também, nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL a atividade anti-inflamatória do FAEHA se mostrou semelhante a do Cetoprofeno ($p > 0,05$) Além disso, o FAEHA 0,5 mg/mL diferiu significativamente de 1,0 mg/mL e este apresentou diferença estatística do grupo 2,0 mg/mL ($p < 0,05$). (Tabela 5).

Tabela 5 - Média e EPM dos valores de inibição de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste de retenção de lisossomos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e extrato nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Parâmetro	CN	CP	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	2,0 mg/mL
% da taxa de inibição	0	93,03*	98,10*	84,73* ^Φ	94,88*
EPM	0	0,65	0,06	2,50	1,67

* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

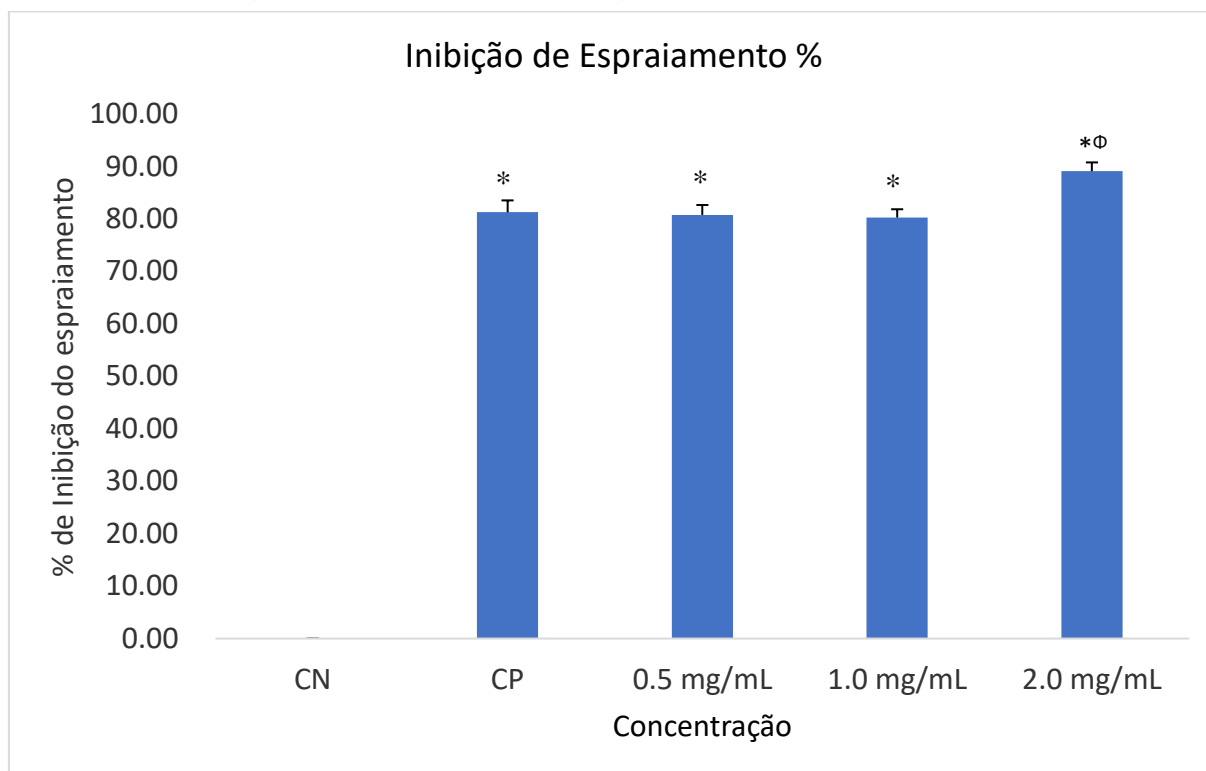
^Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

Fonte: A autora (2020).

3.3.4 Resultados obtidos no teste de espraiamento de macrófagos

A ANOVA *one-way*, seguido de teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que os valores de inibição do espraiamento do controle positivo e do FAEHA em todas as concentrações analisadas, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL, possuem diferenças significativas em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Esses dados permitem comprovar a atividade anti-inflamatória do FAEHA. Como foi observado nos demais testes da avaliação anti-inflamatória, os valores de inibição de espraiamento do teste não apresentam relação dose dependência nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL do FAEHA (80,74% \pm 1,88, 80,24% \pm 1,58, 89,07% \pm 1,68, respectivamente) (Figura 12). Já, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL a atividade anti-inflamatória do FAEHA se mostrou semelhante a do Cetoprofeno ($p > 0,05$). Também os valores de inibição do espraiamento de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL apresentaram diferenças significativas quando comparados com 2,0 mg/mL ($p < 0,05$).

Figura 12 - Média \pm EPM dos valores de inibição de espraio de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.



* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

Fonte: A autora (2020).

Ainda neste ensaio, a ANOVA *one-way* seguido de teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que o FAEHA (0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL) e o controle positivo Cetoprofeno 1,0 mg/mL apresentam diferenças significativas na inibição do espraio, quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$), demonstrando a atividade anti-inflamatória do extrato (Tabela 6). O FAEHA 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL não diferiram significativamente do controle positivo ($p > 0,05$), demonstrando que neste teste ambos apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante. Além disso, a porcentagem de inibição do espraio de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL apresentou diferenças significativas quando comparados com 2,0 mg/mL ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Média e EPM dos valores da % de inibição do espriamento para cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o FAEHA nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Parâmetro	CN	CP	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	2.0 mg/mL
% Inibição de espriamento	0	81,25*	80,74*	80,24*	89,07* ^Φ
EPM	0	2,26	1,88	1,58	1,68

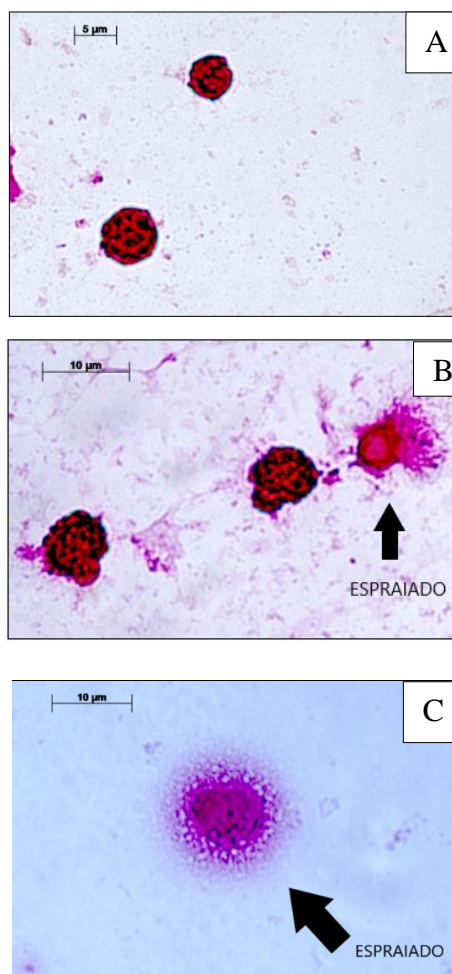
*Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

^Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

Fonte: A autora (2020).

A Figura 13 apresenta a diferença na morfologia entre os macrófagos não-espriados e espriados, obtidas durante a análise das lâminas em microscópio óptico.

Figura 13 -Fotos obtidas de macrófagos não-espriados do grupo CP (A), de macrófagos espriados e não-espriados com o tratamento do FAEHA 2,0 mg/mL (B) e de macrófagos espriados com o tratamento do FAEHA 0,5 mg/mL (C) – aumento 100 x.



Fonte: A autora (2020).

3.3.5 Discussão dos resultados obtidos nos testes anti-inflamatórios *in vitro*

Avaliando os dados de anti-inflamatórios *in vitro* estabelecido neste estudo, nesta etapa foi realizada uma comparação entre os dados obtidos nos testes anti-inflamatórios *in vitro* (fagocitose, retenção de lisossomos e espraiamento de macrófagos) com os que foram obtidos anteriormente com o mesmo extrato no teste *in vivo*, e que ainda não foram publicados. Para isso, os dados da avaliação *in vitro* foram comparados aos obtidos no teste do edema de pata por carragenina, realizado em ratos *Wistar*. Neste teste, o edema constitui um dos sinais da inflamação, sendo causado pelo aumento da permeabilidade vascular e da infiltração celular. A carragenina induz duas fases de inflamação, a aguda e a crônica, a fase aguda se desenvolve nas primeiras 6h após a aplicação local da carragenina a 1% em uma das patas e a fase crônica a partir de 24h, sendo que a fase aguda apresenta um baixo volume de edema (POSADAS *et al.*, 2004; PEDERNERA *et al.*, 2010).

Para a comparação com o trabalho *in vivo* previamente realizado, foram utilizados os resultados obtidos na quarta hora do teste do edema de pata, que corresponde ao período do pico da resposta inflamatória na fase aguda e onde ocorre a migração das células de defesa para o local. Neste tempo, o controle positivo Indometacina 10 mg/kg e o FAEHA na dose de 50 mg/kg, ambos administrados por via oral, em dose única, uma hora antes da administração da carragenina na pata do animal. Houve nestes grupos uma redução significativa o edema de pata em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) que recebeu salina. O FAEHA promoveu 65,67% de redução do edema de pata, ao passo que o anti-inflamatório Indometacina, usado como controle positivo, reduziu o edema em 63,44%. O FAEHA no teste do edema de pata foi avaliado em três doses, 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg. O melhor resultado foi com 50 mg/kg.

Considerando que nos três testes anti-inflamatórios *in vitro* houve diferença estatística significativa entre os tratamentos com o FAEHA comparado com o controle negativo, mostrando que todas as concentrações apresentaram atividade anti-inflamatória, para a comparação dos dados *in vivo* com os obtidos neste estudo *in vitro*, foi utilizada a concentração intermediária do FAEHA de 1,0 mg/mL.

Ao realizar essa observação foi constatado que nos testes da fagocitose, da retenção de lisossomos e do espraiamento de macrófagos as taxas de inibição da

inflamação promovidas pelo FAEHA 1,0 mg/mL foram respectivamente de: 64,70%, 84,73% e 80,24%. A análise comparativa desses resultados com o obtido *in vivo*, que foi de 65,67% de inibição do edema, permite inferir que o teste da fagocitose apresentou um valor bem próximo ao que foi verificado *in vivo*, ou seja, 64,70%. Já os testes da retenção de lisossomos e do espriamento de macrófagos apresentaram valores maiores de inibição da resposta inflamatória, 84,73% e 80,24%, respectivamente. Estes resultados sugerem que estes testes apresentam maior capacidade de detectar este tipo de resposta. Assim, é possível sugerir que esses testes *in vitro* podem ser utilizados de forma a predizer a atividade anti-inflamatória de extratos vegetais, contribuindo para a redução do número de animais nas pesquisas farmacológicas.

Como já mencionado, o macrófago foi a célula escolhida para a realização dos testes anti-inflamatórios *in vitro*. Os macrófagos têm origem da célula tronco hematopoiética e são as células mais diferenciadas do sistema mononuclear fagocitário, sendo encontradas nos tecidos. Nestes locais, os macrófagos têm função fagocitária de primeira linha de defesa da imunidade inata (KUMAR, 2019). Desta forma, utilizando os macrófagos, o primeiro teste anti-inflamatório realizado *in vitro* no presente trabalho foi o teste da fagocitose descrito por Pipe, Coles e Faley (1995) com algumas modificações. Neste teste os macrófagos foram estimulados a fagocitar partículas de zimosan complexadas com vermelho neutro. O zimosan é uma substância oriunda da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, é um forte ativador dos macrófagos, induz a fagocitose e a liberação de enzimas lisossomais e tem a capacidade de induzir inflamação, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas e o mecanismo de fagocitose (SIGOLA *et al.*, 2016).

Assim, considerando que este teste avaliou a atividade anti-inflamatória da FAEHA e do Cetoprofeno, controle positivo, perante a ação do zimosan em induzir a inflamação (SAMPAIO *et al.*, 2001), os resultados mostraram diferença significativa na atividade anti-inflamatória deste extrato.

Outro teste anti-inflamatório realizado *in vitro* com os macrófagos foi o de retenção de lisossomos. O princípio deste teste consiste no fato de o corante vermelho neutro ser catiônico e lipofílico e transitar facilmente pelas membranas celulares. Porém, nos lisossomos, onde o pH é ácido, o corante ganha um próton e fica retido em seu interior. Quanto maior for a resposta inflamatória, maior será a acidez no

interior dos lisossomos e maior o acúmulo do corante vermelho neutro (PIPE; COLES; FARLEY, 1995; OTA *et al.*, 2010). Neste teste, de forma semelhante ao verificado anteriormente, com o da fagocitose, o FAEHA, em todas as concentrações avaliadas, mostraram atividade anti-inflamatória, ou seja, reduziu a retenção do corante no interior dos lisossomos. Novamente foi constatado que as taxas de inibição da retenção de lisossomos promovidas pelo FAEHA apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo.

O último teste anti-inflamatório *in vitro* realizado foi o do espriamento de macrófagos. Esses têm a propriedade de se aderir ao vidro quando estimulados, tornando-se espriadas em diversas condições, entre elas a inflamação (RABINOVITCH *et al.*, 1977). Para verificar se o extrato analisado teria ação de inibir o espriamento dos macrófagos e apresentar atividade anti-inflamatória, essas células foram tratadas com o FAEHA nas mesmas concentrações já mencionadas, assim como com o mesmo controle positivo, o Cetoprofeno 1,0 mg/mL. Como resultado, foi demonstrada diferença significativa na inibição do espriamento para todos os grupos de tratamento com o FAEHA, sugerindo que este extrato é capaz de reduzir a resposta inflamatória promovida pelos macrófagos.

Por fim, vale destacar que o presente trabalho é o primeiro a relatar resultados da atividade anti-inflamatória das espécies do gênero *Agave* nos modelos *in vitro* aqui desenvolvidos. Portanto, não há referências anteriores com *Agave* para comparação.

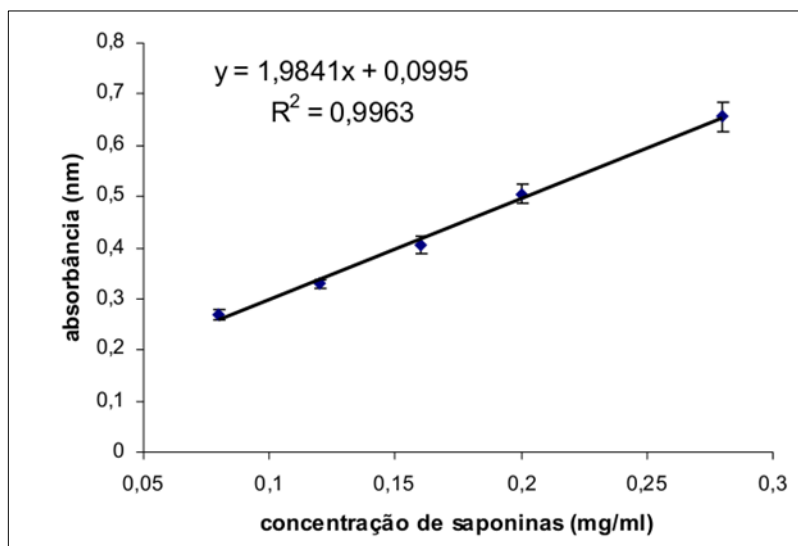
3.4 Ensaios para a determinação da concentração de saponinas e detecção de sapogeninas

Até o momento foram identificados saponinas e sapogeninas em 50 espécies de *Agave* (SIDANA; SINGH; SHARMA, 2016) e aproximadamente 150 tipos de saponinas esteroidais em espécies de *Agave* (ALCAZAR *et al.*, 2017). Para confirmar a presença de saponinas no extrato FAEHA foram realizadas leituras das absorbâncias em espectrofotômetro na faixa de 284 nM.

3.4.1 Resultado obtido no método de determinação da concentração de saponinas

Para o cálculo desta concentração foi empregada a equação da reta estabelecida pela curva de regressão linear com a saponina padrão – Merck, realizada nas doses de 0,08 a 0,28 mg/ml (Figura 14).

Figura 14 - Curva de regressão linear com a saponina Merck nas concentrações de 0,08 a 0,28 mg/mL



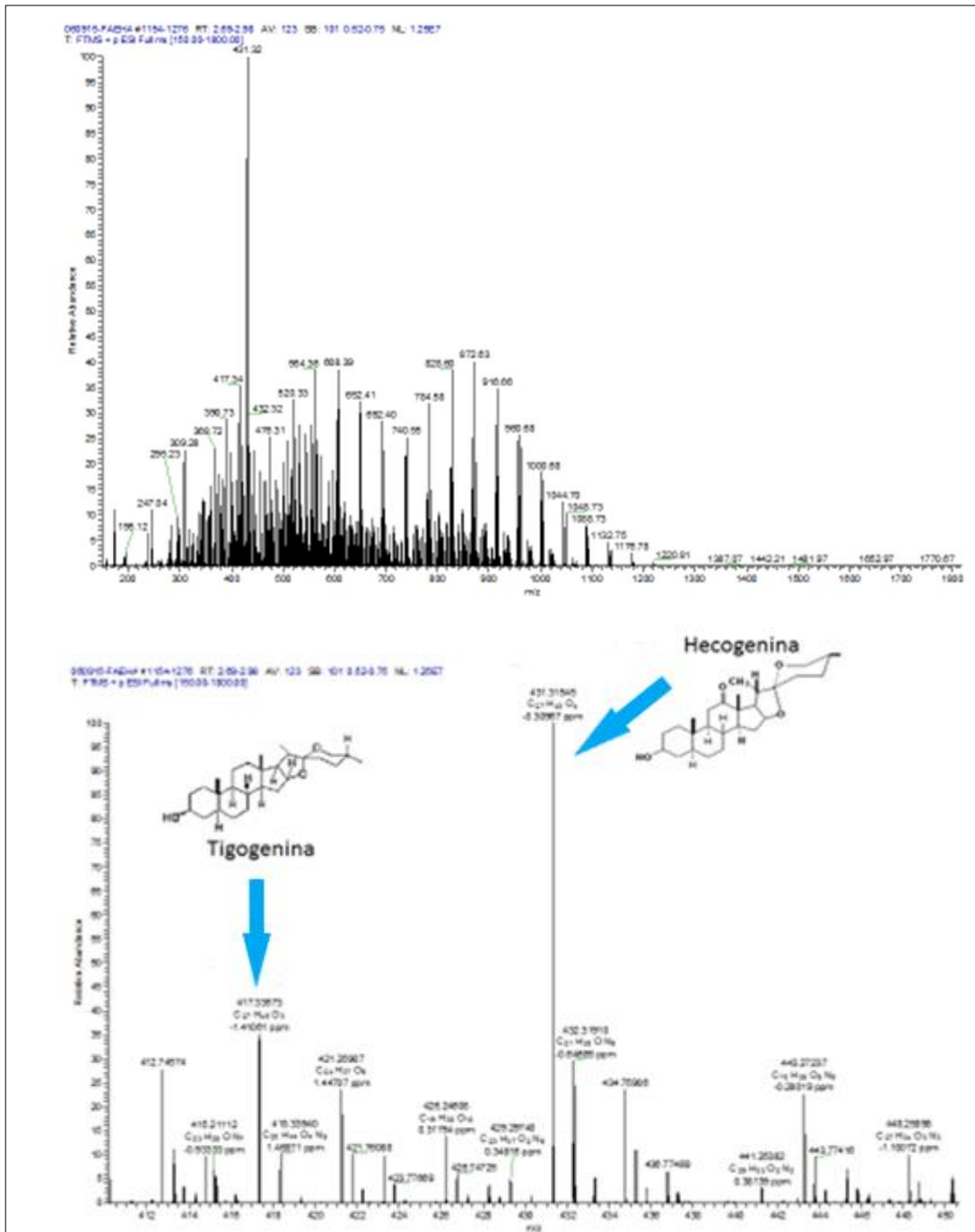
Fonte: A autora (2020).

O FAEHA foi analisado na concentração de 0,25 mg/mL, e o teor de saponinas encontrado foi de 0,12 mg/mL, ou seja, este extrato possui uma concentração proporcional de saponinas de 48%.

3.4.2 Resultado obtido no método de detecção das sapogeninas

Após a detecção das saponinas no extrato, deu-se sequência à caracterização das sapogeninas presentes no FAEHA por emprego da espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS), e os resultados obtidos confirmaram a presença da hecogenina e tigogenina (Figura 15). Também, os inúmeros picos gerados indicam a presença de outros metabólitos secundários nesta fração.

Figura 15 - Espectros obtidos na análise da FAEHA por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Picos identificados de hecogenina e tigogenina



Fonte: A autora (2020).

A Tabela 7 descreve a massa experimental da Tigogenina e Hecogenina, obtidas na análise da FAEHA por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Para fins de comparação, na referida tabela também constam as massas moleculares teóricas das respectivas sapogeninas.

Tabela 7 - Massa das moléculas de hecogenina e tigogenina presentes na FAEHA e obtidas por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS)

Composto	Fórmula Molecular	Massa Teórica [M + H] ⁺	Massa Experimental [M + H] ⁺	Erro (ppm)
Tigogenina	C ₂₇ H ₄₅ O ₃	417,33687	417,33573	1,41
Hecogenina	C ₂₇ H ₄₃ O ₄	431,31613	431,31545	0,31

Fonte: A autora (2020).

3.4.3 Discussão dos resultados obtidos nos ensaios para a determinação da concentração de saponinas e detecção de sapogeninas.

O resultado obtido neste estudo mostra que o FAEHA, mesmo sendo submetido ao processo de hidrólise ácida ainda apresenta alta concentração de saponinas, 48%.

O estudo desenvolvido por Araldi *et al.* (2018) mostrou que o extrato hexânico do sisal, 0,25 mg/mL, obtido após o processo de hidrólise ácida, apresentou 0,02 mg/mL de saponinas, que corresponde proporcionalmente a 18,01% de saponinas da amostra analisada. Os mesmos autores relataram que outro extrato do sisal, o extrato do precipitado, também na concentração de 0,25 mg/mL, e que não foi submetido ao processo de hidrólise ácida e de separação por solvente orgânico, apresentou 0,22 mg/mL de saponinas, ou seja, 88% de saponinas. Este resultado mostra que a hidrólise ácida realizada neste estudo foi eficiente para hidrolisar grande parte das saponinas presentes no extrato do sisal, liberando as sapogeninas esteroidais que foram separadas por meio da extração hexânica.

De acordo com Ding *et al.* (1989), por meio da hidrólise ácida da mucilagem da *Agave sisalana* é possível extrair as cadeias de açúcar das moléculas de saponinas e obter, em especial, duas sapogeninas – hecogenina e tiogenina. Em concordância com o trabalho desenvolvido por Ding *et al.* (1989), os resultados obtidos neste estudo relataram a presença de hecogenina e tiogenina no FAEHA. Também, a presença das sapogeninas hecogenina e tigogeninas na *Agave sisalana* foi detectada por outros pesquisadores (CHEN *et al.*, 2011; DAWIDAR; FAYEZ, 1961; BLUNDEN; YI; JEWERS, 1978; HIGGINS, 1976).

Analisando outras espécies de *Agave*, Alcazar *et al.* (2017) localizaram a hecogenina em extrato de folhas de *Agave durangensis* e *Agave salmiana*. Puente-Garza *et al.* (2017), bem como Blunden, Yi e Jewers (1978), encontraram glicosídeos

de hecogenina, tigogenina e diogenina em folhas de partes maduras de *Agave salmiana*. Pereira *et al.* (2017), identificaram uma nova saponina esteroidal em folhas de *Agave angustifolia var. Marginata*, e após a hidrólise ácida com H₂SO₄, foi isolada a tigogenina. Por sua vez, Eskander, Lavaud e Harakat (2010), isolaram a saponina da planta *Agave macroacantha* e com o emprego de espectrometria de massa, foi isolada a sapogenina hecogenina.

A importância das sapogeninas deve-se ao fato de que elas são precursoras dos corticosteroides, anti-inflamatórios, de grande utilização na medicina. Embora o mecanismo de ação das sapogeninas não seja conhecido, Quintans *et al.* (2014) trataram camundongos por administração sistêmica de acetato de hecogenina em modelos de hiperalgesia por carragenina e observaram uma redução de citocinas como IL1- β e a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, Cerqueira *et al.* (2012) constataram que a hecogenina isolada de *Agave sisalana* reduziu *in vivo* a atividade anti-inflamatória. Em adição, analisando o extrato de *Agave americana*, Peana *et al.* (1997) identificaram as sapogeninas hecogenina e tigogenina. As sapogeninas foram administradas via intraperitoneal e produziram atividade antiedematosa maior que os anti-inflamatórios comerciais Indometacina e Dexametasona, em modelos de animais.

Diante dos dados obtidos na literatura, é possível constatar que, de forma inovadora, o presente trabalho representa o primeiro estudo sobre a atividade anti-inflamatória de extrato de *Agave sisalana in vitro*. Além disso, sugere o FAEHA possui atividade anti-inflamatória, e que esta pode ser atribuída à presença de saponinas e sapogeninas esteroidais. Em complemento, em razão da baixa toxicidade apresentada, o FAEHA se apresenta como um medicamento anti-inflamatório em potencial, podendo agregar valor econômico ao resíduo do sisal que está sendo desprezado.

4 CONCLUSÃO

O conjunto de dados obtidos na análise toxicológica do FAEHA, por meio da realização dos testes *in vitro*, confirmam a baixa toxicidade do extrato.

De modo similar, os dados obtidos *in vitro*, por intermédio dos testes que avaliaram a atividade anti-inflamatória do FAEHA, comprovando a atividade farmacológica do extrato.

A presença de saponinas e das sapogeninas hecogenina e tigogenina no FAEHA sugere que essas moléculas seriam efectoras da atividade anti-inflamatória do extrato.

Os testes realizados *in vitro* neste estudo se mostraram confiáveis para serem utilizados na avaliação de potencial tóxico e anti-inflamatório dos extratos vegetais, contribuindo para a redução do número de animais nas pesquisas farmacológicas e toxicológicas.

A confirmação *in vitro* da baixa toxicidade do FAEHA e da sua atividade anti-inflamatória, anteriormente observadas *in vivo*, coloca esse extrato como potencial candidato ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico.

Por fim, a utilização do resíduo das folhas do sisal para o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode se configurar como uma estratégia inovadora para abrir frente a projetos sociais e é de fundamental importância para o incremento econômico e social da região sisaleira do nordeste brasileiro, uma das mais pobres do país.

REFERÊNCIAS

- ALCAZAR, M. *et al.* Effect of steroidal saponins from *Agave* on the polysaccharide cell wall composition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* Montserrat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 430-439, apr. 2017.
- ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: GESEF, 2013. (Versão 2).
- ARALDI, R. P. *et al.* Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of *Agave sisalana* Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 873-885, feb. 2018.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. de; CASTRO, S. L. de (org.). **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000.
- ARYAEIAN, N. *et al.* The effect of ginger supplementation on some immunity and inflammation intermediate genes expression in patients with active Rheumatoid Arthritis. **Gene**, v. 698, p. 179-185, 2019.
- BADERNA, D.; CALONI, F.; BENFENATI, E. Investigating land fill leachate toxicity *in vitro*: A review of cell models and endpoints. **Environment international**, v. 122, p. 21-30, 2019.
- BARBOSA, H. S.; PEREIRA, M. C. S.; MEIRELLES, M. de N. S. L. Obtenção de células de camundongo para estudos *in vitro* em cultivo primário: Protocolos de cultura primária. *In*: ARAÚJO-JORGE, T. C. de; CASTRO, S. L. de (org.). **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. Cap. 18.2, p. 297-313.
- BARRETO, S. M. A. G. *et al.* Evaluation of *in vitro* and *in vivo* safety of the by-product of *Agave sisalana* as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 470-479, 2017.
- BLUNDEN, G.; YI, Y.; JEWERS, K. Steroidal saponin from leaves of *Agavaceae* species. **Phytochemistry**, v. 17, n. 11, p. 1923-1925, 1978.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, n. 2-3, p. 119-124, feb./mar. 1985.
- BOTURA, M. B. **Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana* Perr. (sisal) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

BOTURA, M. B. *et al.* *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 211-217, feb. 2013.

BOTURA, M. B. *et al.* *In vivo* anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 104-110, apr. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA - **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, DF: MCTICMS/ANVISA, [2014a].

Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3171284/%284%29RDC_26_2014_CO MP.pdf/c83eaf06-cde5-4fa5-9e70-9d19369233f2. Acesso em: 03 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014**. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Brasília, DF: MCTIC, [2014b]. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf. Acesso em: 03 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016**. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Brasília, DF: MCTIC, [2016]. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf. Acesso em: 02 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 35, de 7 de agosto de 2015**. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea. Brasília, DF: MS/ANVISA, [2015]. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_35_2015_.pdf/e96e3d5d-0572-4e50-8b76-561223a23b80?version=1.0. Acesso em: 03 mai. 2020.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. **Levantamento Sistemático Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 12, p. 1-82, dez. 2017.

CARDOSO, M. S. Panorama Tecnológico de uso de Resíduos do Sisal. **Semioses: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 13-23, 2019.

CERQUEIRA, G. S. *et al.* Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 683, p. 260-269, 2012.

CHEN, P. Y. *et al.* Cytotoxic Steroidal Saponins from *Agave sisalana*. **Planta Medica**, v. 77, n. 9, p. 929-933, jan. 2011.

CUDAZZO, G. *et al.* Lysosomotropic-related limitations of the BALB/c 3T3 cell-based neutral red uptake assay and na alternative testing approach for assessing e liquid cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 61, dec. 2019.

DAWIDAR, A. A.; FAYEZ, M. B. E. Steroid Sapogenins. III. Distribution of Steroid Sapogenins in the Sisal Plant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 92, n. 3, p. 120-423, mar. 1961.

DELLA LIBERA, A. *et al.* Macrófagos lácteos de búfalas híginas: avaliações da fagocitose, espraiamento e liberação de H₂O₂. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 412-419, 2006.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais ao fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DING, Y., *et al.* Steroidal Saponins From Cultived Form of *Agave Sisalana*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2787-2791, 1989.

DONG, J. *et al.* Saponins regulate intestinal inflammation in colon cancer and IBD. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 66-72, jun. 2019.

DUNDER, R. J. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic potential of hydrolyzed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Asparagaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 376-381, 2010.

DUNDER, R. J. *et al.* Applications of the hexanic fraction of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Asparagaceae): control of inflammation and pain screening. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 263-271, mai. 2013.

EISEMBRAND, G. *et al.* Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

ESKANDER, J.; LAVAUD, C.; HARAkat, D. Steroidal saponins from the leaves of *Agave macroacantha*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 371-374, jul. 2010.

FENG, L. *et al.* Resveratrol differentially modulates immune responses in human THP-1 monocytes and macrophages. **Nutrition Research**, v. 72, p. 57-69, 2019.

FUENTES, A. L.; MILLIS, L.; SIGOLA, L. B. Laminarin, a soluble beta-glucan, inhibits macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide mediated augmentation of phagocytosis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1939-1945, 2011.

HANIFFA, M.; BIGLEY, V.; COLLIN, M. Human mononuclear phagocyte system reunited. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 41, p. 59-69, 2015.

HIGGINS, J. W. A high-performance liquid chromatographic analysis of the benzoate esters of saponins isolated from *Agave*. **Journal of Chromatography**, v. 121, n. 2, p. 329-334, jun. 1976.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices**. Genève, 2009.

KHAN, A. *et al.* Investigation of the preliminary mechanism of action for the acute anti-inflammatory activity of the methanol extract of *Smilax ornata* Lem. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, 112360, feb. 2020.

KOMAKECH, R. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic potential of *Tamarindus indica* Linn. (Fabaceae): a narrative review. **Integrative Medicine Research**, v. 8, n. 3, p. 181-186, set. 2019.

KUMAR, V. Macrophages: The Potent Immunoregulatory Innate Immune Cells. *In*: BHAT, K. H. **Macrophage Activation - Biology and Disease**. Londres: Intech Open, 2019. p. 1-30.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical Reports**, v. 3, p. 617-620, 2015.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 732-738, 2015.

MARCHISSIO, M. J. *et al.* Mitochondrial aquaporin-8 knockdown in human hepatoma HepG2 cells causes ROS-induced mitochondrial depolarization and loss of viability. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 246-254, 2012.

MAYASSI, T. *et al.* Chronic Inflammation Permanently Reshapes Tissue-Resident Immunity in Celiac Disease. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 967-981, feb. 2019.

MONJA-MIO, K. M. *et al.* Epicuticular wax analysis of wild and agronomically important *Agave* species. **Phytochemistry Letters**, v. 34, p. 103-107, dec. 2019.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dec. 1983.

NOBEL, P. S.; McDANIEL, R.G. Low temperature tolerances, nocturnal acid accumulation, and biomass increases for seven species of *Agave*. **Journal of Arid Environments**, v. 15, n. 2, p. 147-155, nov. 1988.

NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS. **The Ethics of Research Involving Animals**. Londres: Nuffield Council on Bioethics, 2005.

ODA, K. *et al.* Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biological Chemistry**, v. 381, n. 1, p. 67-74, jan. 2000.

OLIVEIRA, L. H. G. *et al.* *Agave sisalana* extract induces cell death in *Aedes aegypti* hemocytes increasing nitric oxide production. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 396-399, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals - Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. **OECD 423**, 2002. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf. Acesso em: 02 mai. 2020.

OTA, C. C. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do *Allium sativum* (alho). **Tuiuti: Ciência e Cultura**, Curitiba, n. 43, p. 37-49, 2010.

PEANA, A. T. *et al.* Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponinins of *Agave americana*. **Planta Medica**, v. 63, n. 3, p. 199-202, jun. 1997.

PEDERNERA, A. M. *et al.* Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. **Inflammopharmacology**, v. 18, p. 253-260, 2010.

PEREIRA, G. M. *et al.* Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. Marginata and a preliminary investigation of its *in vivo* antiulcerogenic activity and *in vitro* membrane permeability property. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 18, p. 4345-4349, sep. 2017.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. *In*: KRUSE JR., P. F.; PATTERSON JR., M. K. (ed.). **Tissue Culture Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1973. p. 406-408.

PIEMONTE, M. R.; BUCHI, D. F. Analysis of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, $\alpha 5 \beta 1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 34, n. 3, p. 255-263, jul. 2002.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Techniques in Fish Immunology**, v. 4, p. 93-100, 1995.

POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, mai. 2004.

POURAHMAD, J.; SALIMI, A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 679-980, 2015.

PUENTE-GARZA, C. A. *et al.* Effect of *in vitro* drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 400-407, jun. 2017.

- QABAHA, K. et al. Anti-inflammatory activity of *Eucalyptus* spp. and *Pistascia Lentiscus* leaf extracts. **African Journal of Traditional and Alternative Medicines**, v. 13, n. 5, p. 1-6, 2016.
- QUEIROZ, S. R. O. D. et al. Análise cromossômica em bulbilhos de sisal (*Agave* spp.) cultivados em diferentes municípios baianos, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Alta Floresta, v. 26, n. 4, p. 842-848, 2012.
- QUINTANS, J. S. et al. Evidence for the Involvement of Spinal Cord-Inhibitory and Cytokines-Modulatory Mechanisms in the Anti-Hyperalgesic Effect of Hecogenin Acetate, a Steroidal Sapogenin-Acetylated, in Mice. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8303-8316, jun. 2014.
- RABINOVITCH, M. et al. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers macrophage spreading *in vitro*. **Cellular Immunology**, v. 29, n. 1, p. 86-95, 1977.
- RAFIŃSKA, K. et al. *Medicago Sativa* as a Source of Secondary Metabolites for Agriculture and Pharmaceutical Industry. **Phytochemistry Letters**, v. 20, p. 520-539, 2017.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- RINGROSE, P. S.; PARR, M. A.; MCLAREN, M. Effects of anti-inflammatory and other compounds on the release of lysosomal enzymes from macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 5, p. 607-614, 1975.
- ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SAMPAIO, S. C. et al. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 4, p. 551-558, 2001.
- SANTOS, J. D. G. et al. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1997-2001, 2013.
- SARTIM, M. A.; MENALDO, D. L.; SAMPAIO, S.V. Immunotherapeutic potential of Crotoxin: anti-inflammatory and immunosuppressive properties. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n.39, 2018.
- SEGAL, R.; SHATKOVSKY, P.; MILO-GOLDZWEIG, I. On the mechanism of saponin hemolysis-I hydrolysis of the glycosidic bond. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, n. 5, p. 973-981, mar. 1974.
- SIDANA, J.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. **Phytochemistry**, v. 130, p. 22-46, out. 2016.
- SILVA, O. R. R.F. da et al. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. **Circular Técnica. Campina Grande, PB**, n. 123, jul. 2008.

- SIGOLA, L. B. *et al.* Effects of Toll-like receptor ligands on RAW 264.7 macrophage morphology and zymosan phagocytosis. **Tissue and Cell**, v. 48, n. 4, p. 389-396, 2016.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.
- SOUZA, I. C. *et al.* Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). **Natureza on line**, v. 9, n. 2, p. 54-58, 2011.
- SRIVASTAVA, G. K. *et al.* Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1425, 2018.
- ST PIERRE, C. S. *et al.* A human tissue-based functional assay platform to evaluate the immune function impact of small molecule inhibitors that target the immune system. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0180870, jul. 2017.
- TERRAPON-PFAFF, J. C.; FISCHEDICK, M.; MONHEIM, H. Energy potentials and sustainability - the case of sisal residues in Tanzania. **Energy for Sustainable Development**, v. 16, n. 3, p. 312-319, sep. 2012.
- TSUBOY, M. S. *et al.* *In vitro* evaluation of the genotoxic activity and apoptosis induction of the extracts of roots and leaves from the medicinal plant *Coccolobamollis* (Polygonaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 3, p. 503-508, 2010.
- UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 3, p. 176-180, 2003.
- VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL 50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
- VIEHMANN, S. F. *et al.* The multifaceted role of the renal mononuclear phagocyte system. **Cellular Immunology**, v. 330, p. 97-104, aug. 2018.
- VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng). Pedersen – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.
- WEINTRAUB, N. L. The role of inflammation in health and disease: Translating discovery into novel therapeutic approaches. **Translational Research**, v. 160, n. 1, p. 97-98, 2012.
- YANG, J. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.
- YISHUO, Y. *et al.* Efficient extraction of pectin from sisal waste by combined enzymatic and ultrasonic process. **Food Hydrocolloids**, n. 79, p.189-196, jun. 2018.

YONG, S. B. *et al.* Mononuclear phagocytes as a target, not a barrier, for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 259, p. 53-61, aug. 2017.

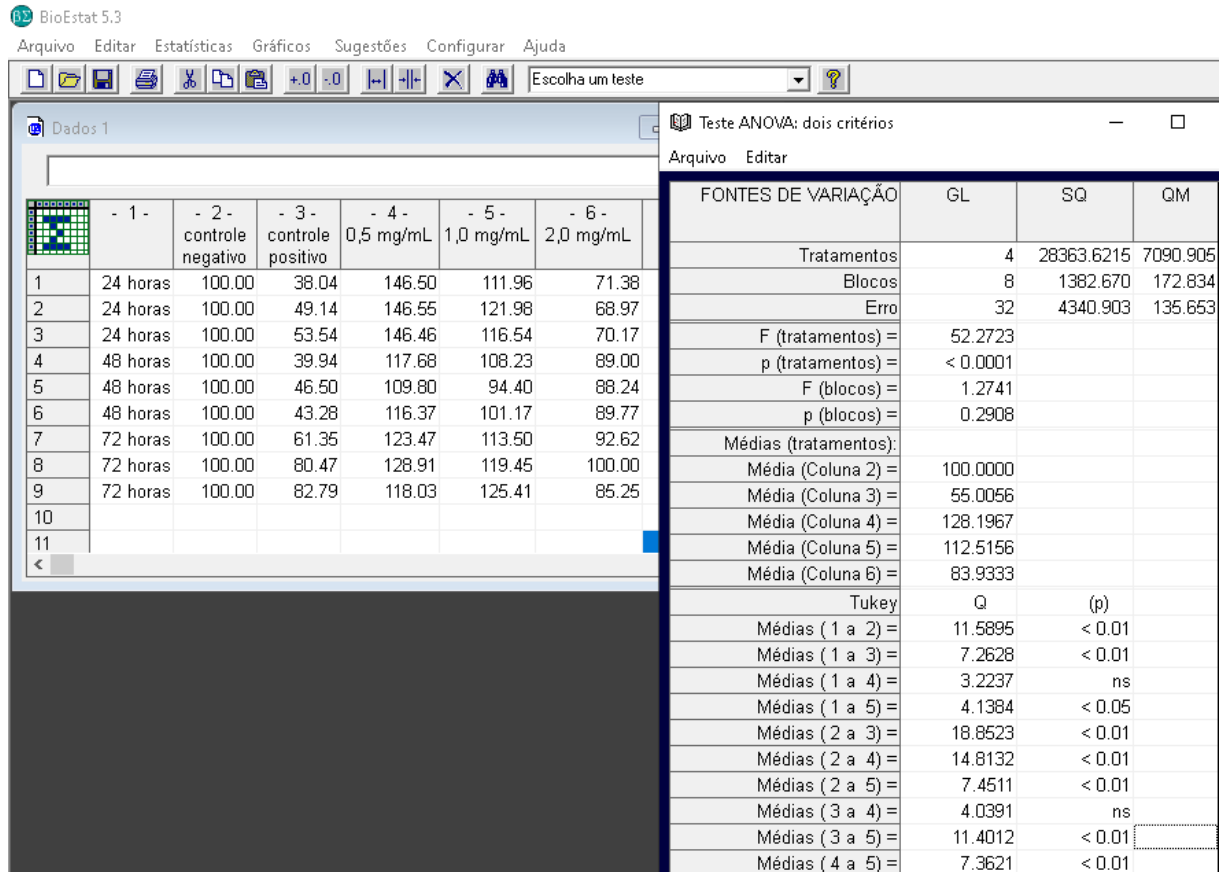
ZAJÍCKOVÁ, M. Z. *et al.* Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 2, p. 430-437, 2020.

ZIMMERMANN-FRANCO, D. C. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties of imine resveratrol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 17, p. 4898-4906, aug. 2018.

APÊNDICE A - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES *IN VITRO*

1 Teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] -

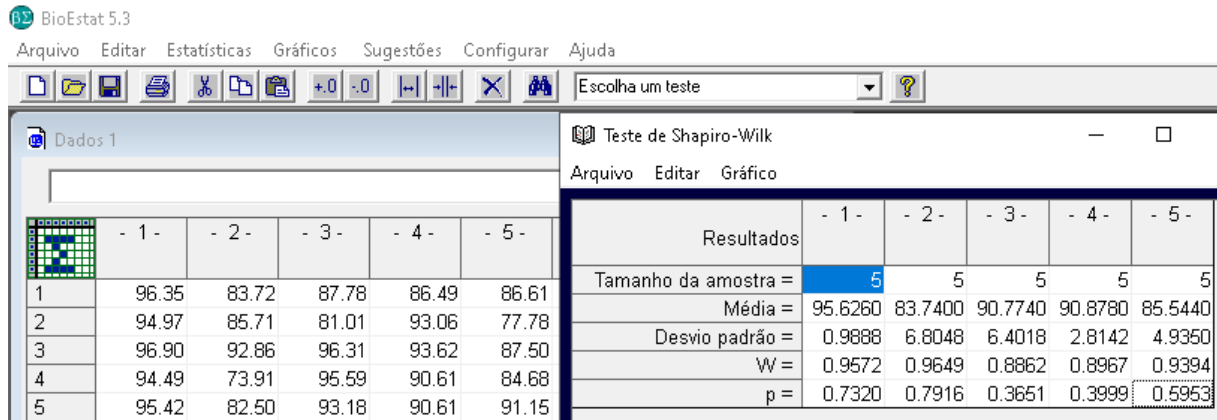
Figura 1 - Análise estatística de ANOVA *two-way*, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, no tempo 24, 48 e 72 horas, em que coluna 2: controle negativo, coluna 3: controle positivo, coluna 4: 0,5 mg/mL, coluna 5: 1,0 mg/mL, coluna 6: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

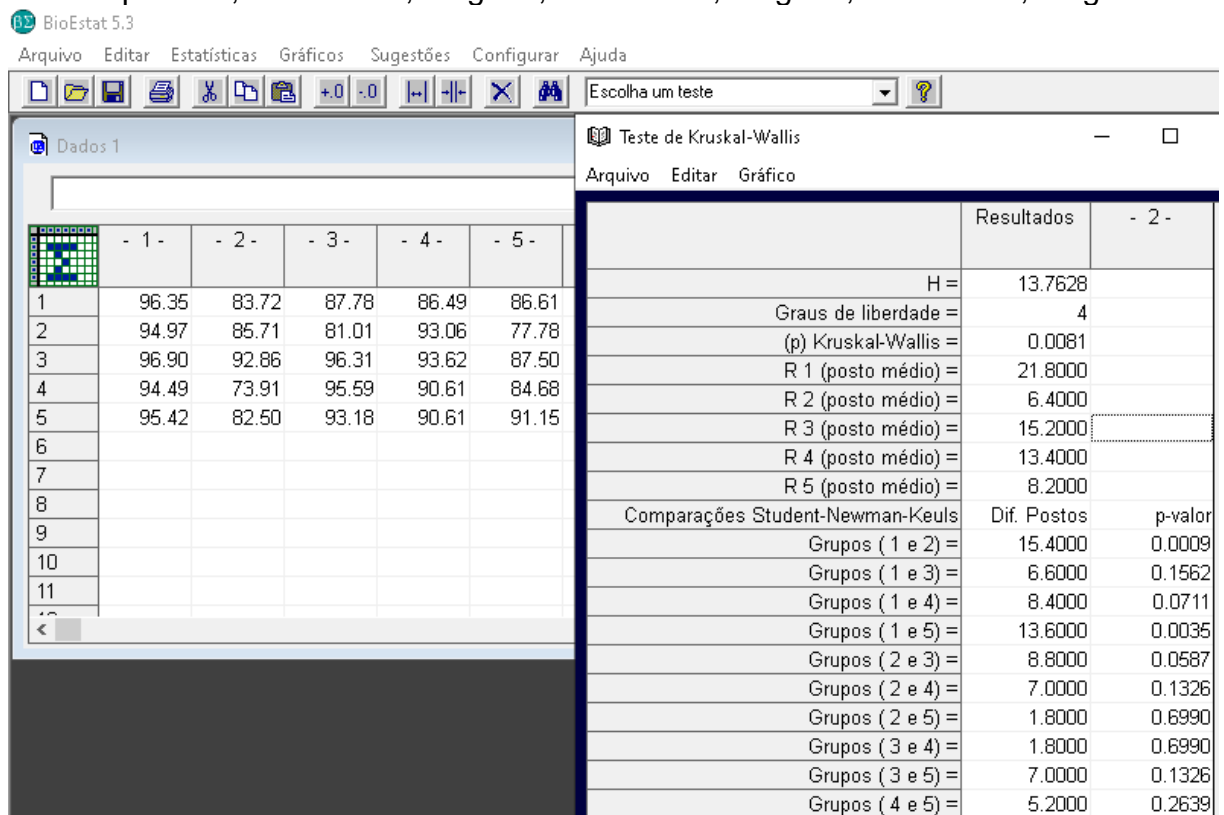
2 Teste de exclusão do azul de Trypan - tempo 24 horas

Figura 2a -Análise estatística de normalidade com Teste de Shapiro-Wilk, onde: coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

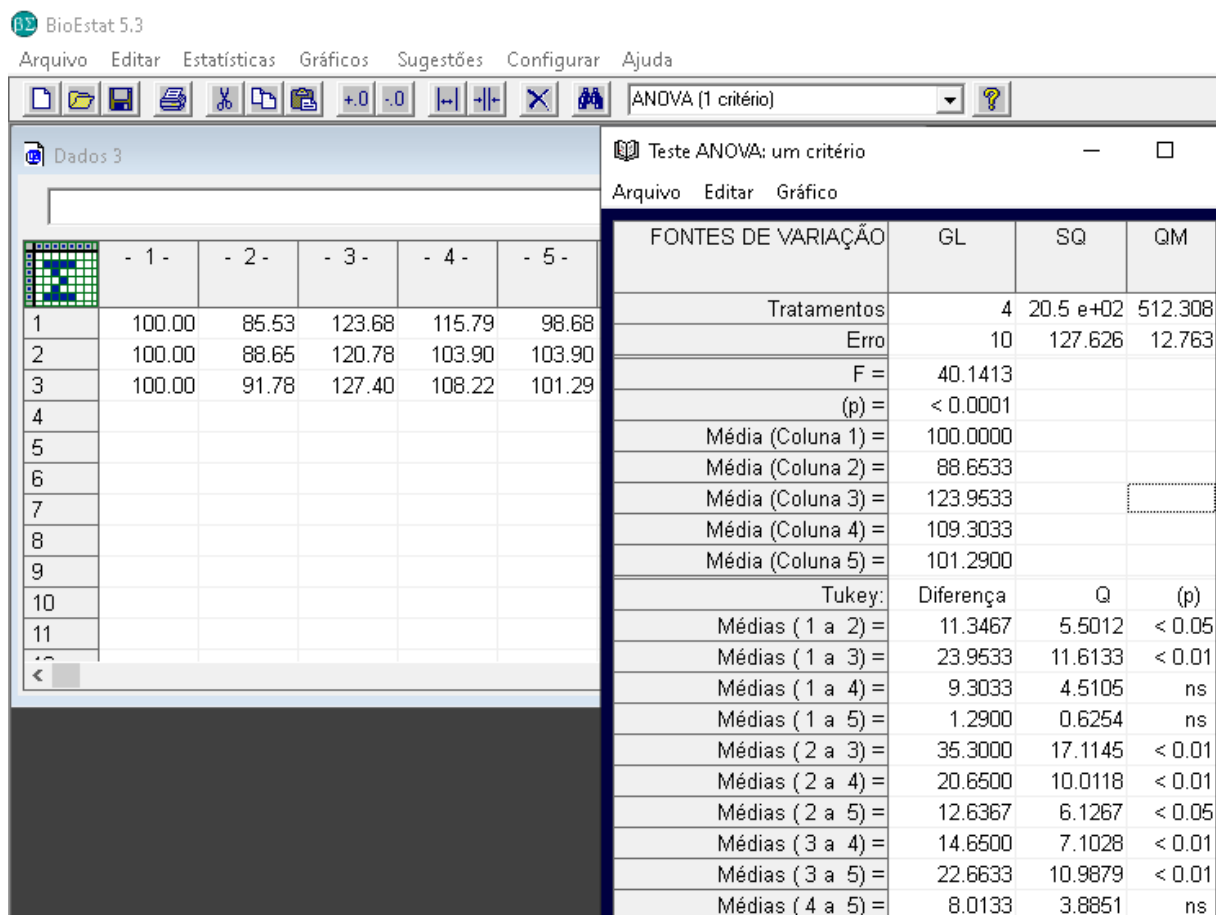
Figura 2b -Análise estatística de Kruskal-Wallis, seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls, onde: coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

3 Ensaio de incorporação do vermelho neutro

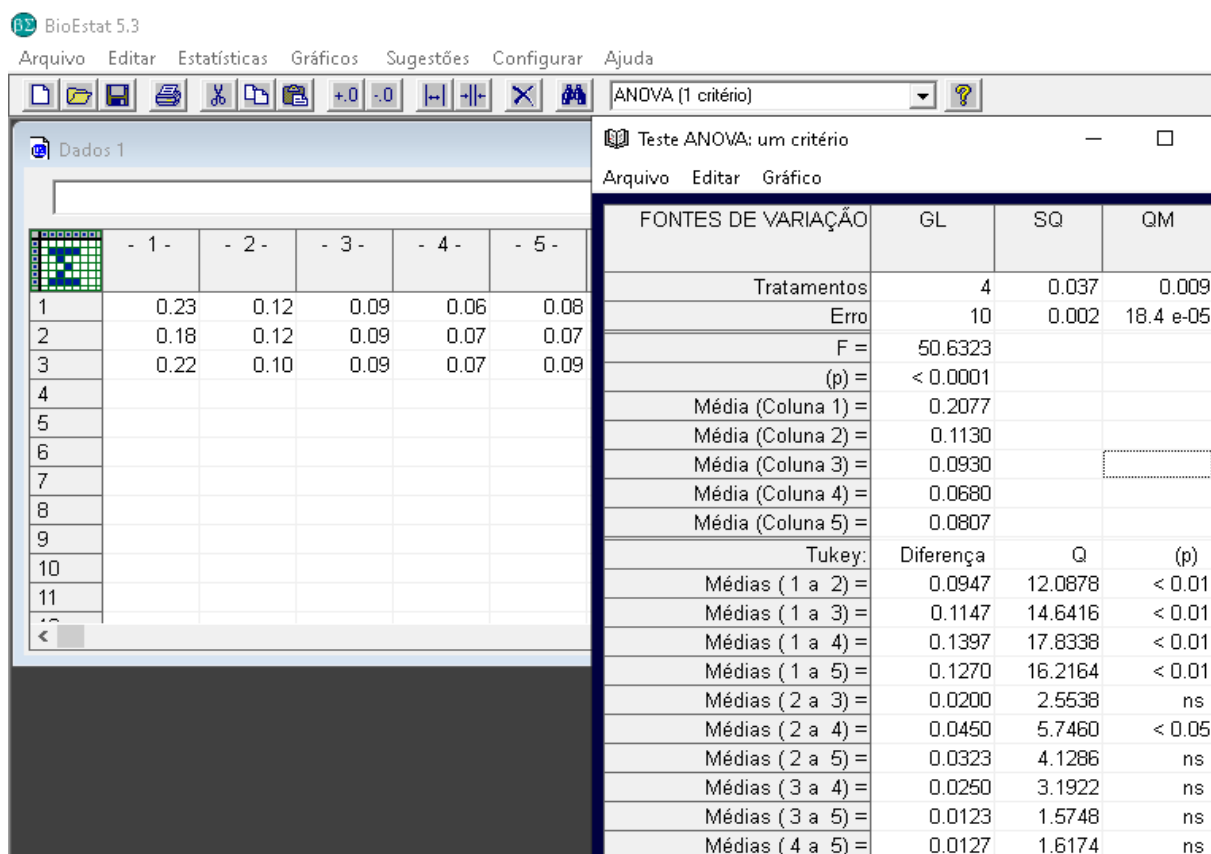
Figura 3 - Análise estatística de ANOVA *one-way*, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, no tempo 24 horas, em que coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

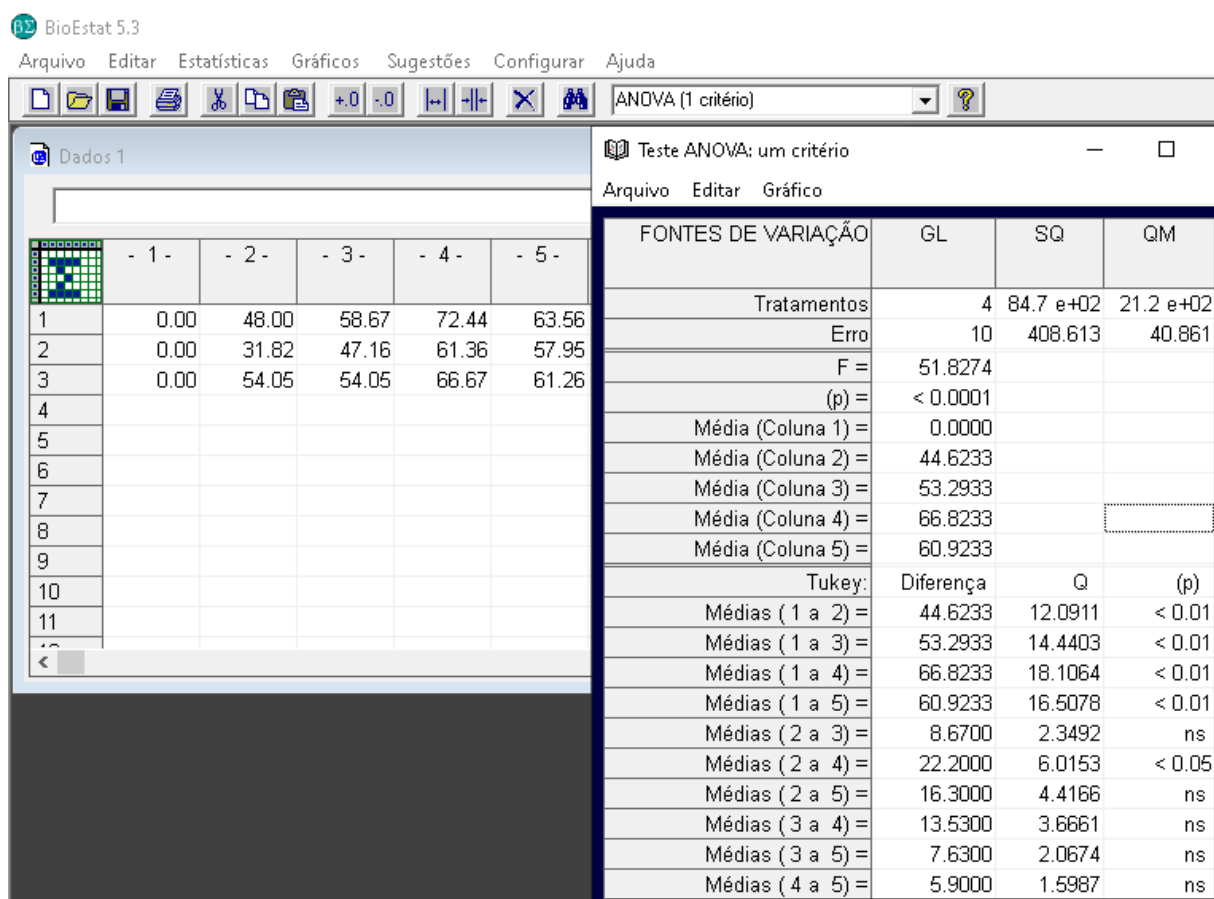
4 Teste de Fagocitose

Figura 4a -Análise estatística de ANOVA *one-way* das absorvâncias, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, onde coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

Figura 4b -Análise estatística de ANOVA *one-way* de porcentagem de inibição da fagocitose, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, onde coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

5 Retenção de lisossomos

Figura 5a -Análise estatística de ANOVA *one-way* das absorbâncias, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, em que coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL

The screenshot displays the BioEstat 5.3 interface. The main window shows a data table with 11 rows and 6 columns. The first column is labeled 'Dados 8' and contains row numbers 1-11. The next five columns are labeled '- 1 -', '- 2 -', '- 3 -', '- 4 -', and '- 5 -'. The data values are as follows:

	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -
1	0.052	0.003	0.001	0.006	0.004
2	0.050	0.004	0.001	0.010	0.001
3	0.056	0.004	0.001	0.008	0.004
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

The right-hand window, titled 'Teste ANOVA: um critério', displays the following summary statistics:

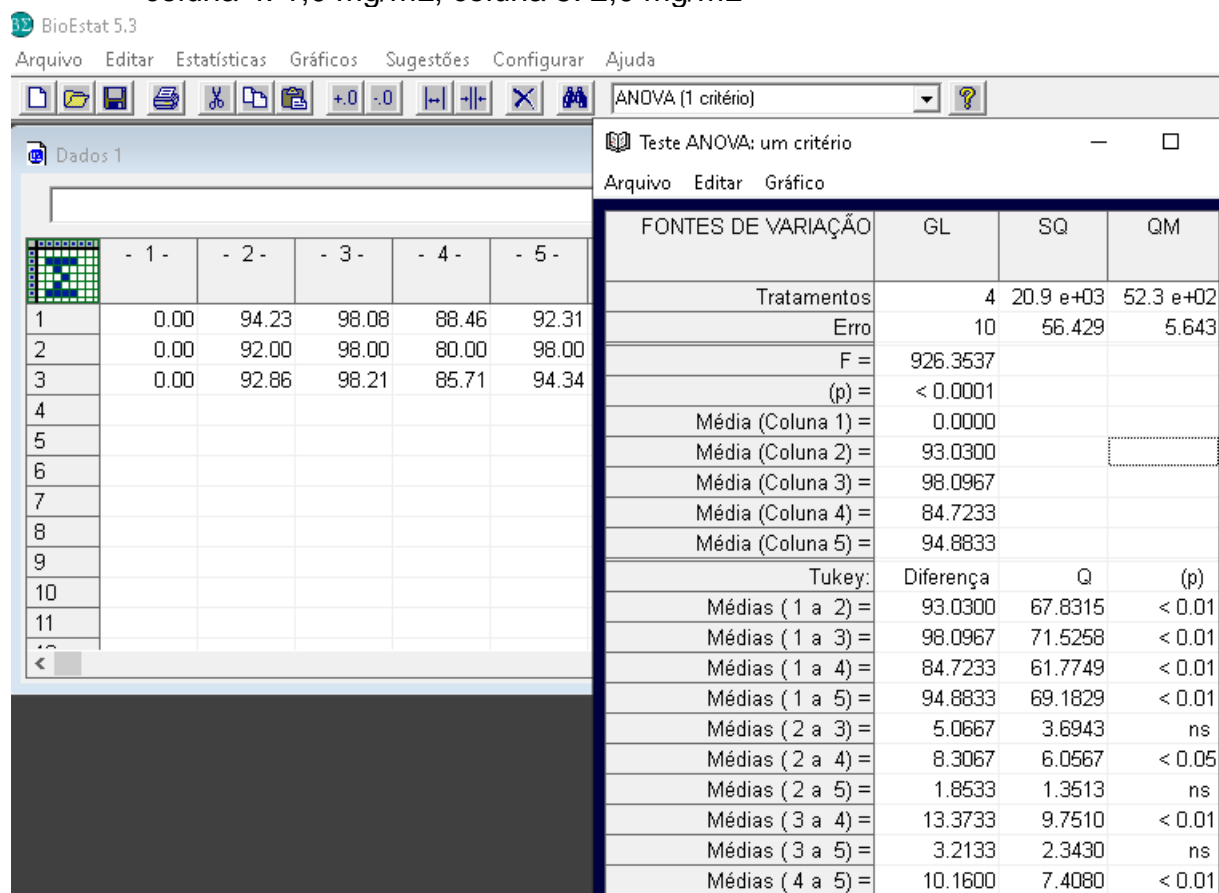
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	0.006	0.001
Erro	10	33.3 e-06	30.0 e-07
F =	433.6500		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	0.0527		
Média (Coluna 2) =	0.0037		
Média (Coluna 3) =	0.0010		
Média (Coluna 4) =	0.0080		
Média (Coluna 5) =	0.0030		

The Tukey post-hoc test results are shown in the following table:

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	0.0490	49.0000	< 0.01
Médias (1 a 3) =	0.0517	51.6667	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0.0447	44.6667	< 0.01
Médias (1 a 5) =	0.0497	49.6667	< 0.01
Médias (2 a 3) =	0.0027	2.6667	ns
Médias (2 a 4) =	0.0043	4.3333	ns
Médias (2 a 5) =	0.0007	0.6667	ns
Médias (3 a 4) =	0.0070	7.0000	< 0.01
Médias (3 a 5) =	0.0020	2.0000	ns
Médias (4 a 5) =	0.0050	5.0000	< 0.05

Fonte: A autora (2020).

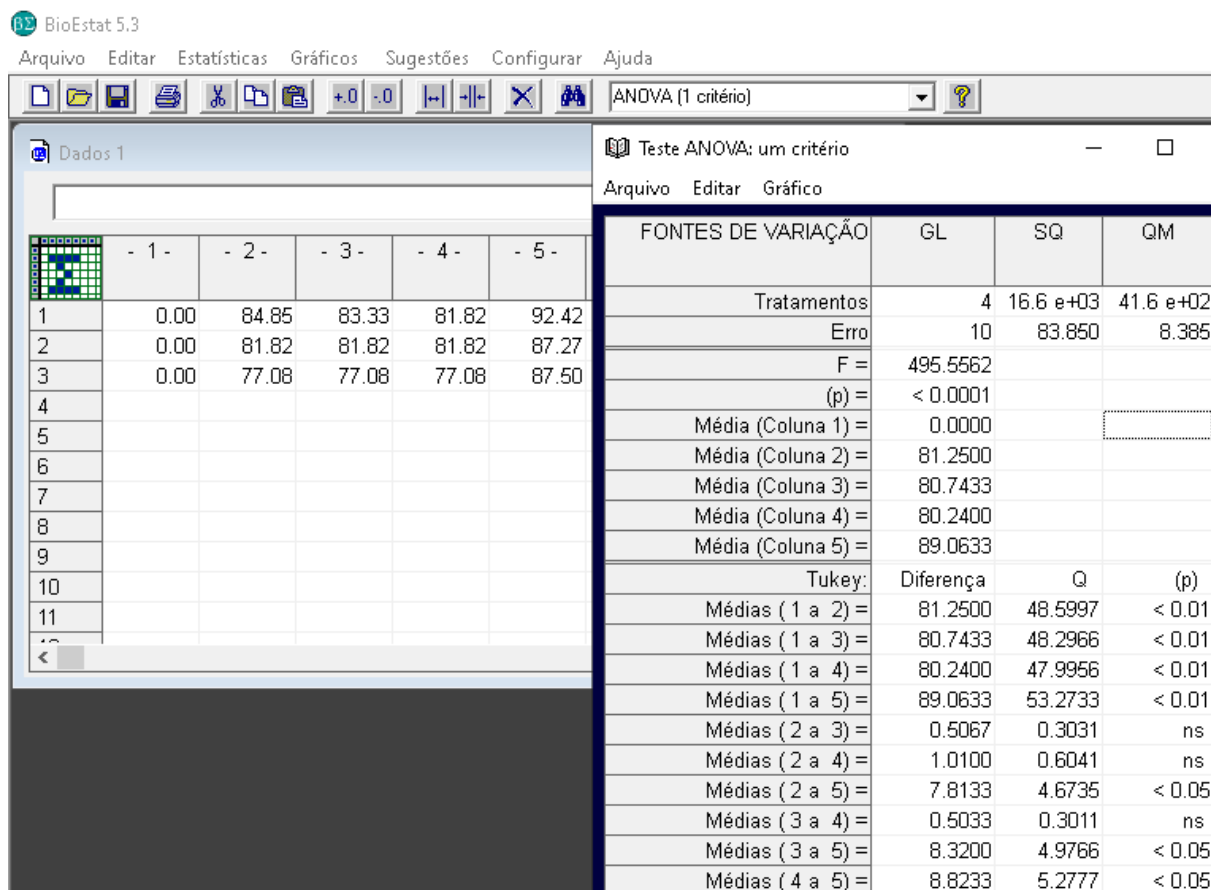
Figura 5b -Análise estatística de ANOVA *one-way* de porcentagem de inibição de retenção de lisossomos, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, onde coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).

6 Espreadimento de macrófagos

Figura 6 - Análise estatística de ANOVA *one-way* da porcentagem de inibição de espreadimento, seguida de teste *post-hoc* de Tukey, em que coluna 1: controle negativo, coluna 2: controle positivo, coluna 3: 0,5 mg/mL, coluna 4: 1,0 mg/mL, coluna 5: 2,0 mg/mL



Fonte: A autora (2020).